

# **Strukturbasiertes Design, Synthese und pharmakologische Evaluation von Proteasom- und FLT3- Inhibitoren in Leukämiemodellen**



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

**Dissertation**

von

**Dipl.-Chem. Daniel Stubba**

Erstgutachter:

Prof. Dr. Boris Schmidt

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Felix Hausch

**Darmstadt 2020**

---

Stubba, Daniel: Strukturbasiertes Design, Synthese und pharmakologische Evaluation von Proteasom- und FLT3-Inhibitoren in Leukämiemodellen

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2020

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2020

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

Tag der Einreichung: 17. Januar 2020

Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 2020

---

---

>> *There's a way to do it...find it!*<<

-Thomas A. Edison-

Für meine Familie.

---

---

Die Vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Boris Schmidt in der Zeit von Dezember 2015 bis Januar 2020 am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.

---

---

## Danksagungen

---

Mein erster und besonderer Dank gilt meinem Doktorvater *Boris Schmidt* für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, das spürbare Vertrauen in mich sowie die stete Unterstützung und die wissenschaftlichen Freiheiten, die ich während meiner Dissertation genießen durfte.

Ich danke *Felix Hausch* für die Übernahme des Koreferats.

*Dennis* danke ich für die großartige gemeinsame Zeit seit Beginn meiner Promotion. Besonders die Ära im gemeinsamen Labor hat durch unser Teamwork sowie der gegenseitigen Motivation, entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Es gab keinen Tag, an dem ich nicht gerne ins Labor gekommen bin und selbst die Reparatur einer Spülmaschine konnte mit dir Spaß machen. Es liegen zwar heute noch Teile daneben, sie läuft aber immer noch.

Ich danke den aktiven und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises *Johanna, Georg, Chris, Theresa, Johannes* und *Annicet* für die stete Hilfsbereitschaft, das gute Arbeitsklima und die großartigen Zeiten auch außerhalb des Labors.

*Steffi* und *Vicky* danke ich für ihre nette und hilfsbereite Art und dafür, dass ihr immer ein offenes Ohr habt. An unsere gemeinsamen Aktionen erinnere ich mich gerne zurück.

*Julian*, meinem Hiwi für das KC-Praktikum, danke ich für seinen Einsatz und das große Engagement bei allen Themen, die das Praktikum betrafen und darüber hinaus. Mit dir wurde es nie langweilig und ich habe sehr gerne mit dir zusammengearbeitet – *Jetzt geh' ich heim!*

Vielen Dank auch an meine Studenten *Álvaro, Basti, Felix, Janika, Lili* und *Simone* die ich im Rahmen von Forschungspraktika sowie Bachelor- und Masterarbeiten betreuen und hierbei wertvolle Erfahrungen sammeln durfte.

*Carina, Ellen* und *Georg* danke ich für die gemeinsame Zeit im GRK. Durch euch wurden selbst die Retreats nie langweilig.

Ich danke *Barbara Gantt, Anke Imrich, Tobias Meckel, Reinhard Meusinger, Alexander Schießler* und *Jürgen Ühlken* für wertvolle technische und administrative Unterstützung.

*Michael Groll, Gergely L. Lukacs, Stefan Roth* und *Katja Schmitz* danke ich für die unkomplizierten und erfolgreichen Kooperationen.

Abschließend möchte ich ganz besonders meiner Familie und meiner Freundin *Melanie* danken. Vielen Dank für eure Unterstützung, euer Vertrauen in mich, eure Geduld – einfach für alles!

Zuletzt danke ich besonders meinen Eltern für das Näherbringen der Wissenschaft schon in meiner Kindheit. Durch die geweckte Wissbegierde war der Weg zu dieser Arbeit erst möglich.

---

---

## Veröffentlichungen

---

Folgende Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

### **Cell-Based Optimization of Covalent Reversible Ketoamide Inhibitors Bridging the Unprimed to the Primed Site of the Proteasome $\beta$ 5 Subunit**

D. Stubba,<sup>#</sup> D. Bensinger,<sup>#</sup> J. Steinbacher, L. Proskurjakov, Á. Salcedo Gómez, S. Roth, K. Schmitz und B. Schmidt

*ChemMedChem* **2019**, 14, 2005 – 2022.

### **Virtual Screening Identifies Irreversible FMS-like Tyrosine Kinase 3 Inhibitors with Activity towards Resistance-conferring Mutations**

D. Bensinger, D. Stubba, A. Cremer, V. Kohl, T. Waßmer, J. Stuckert, V. Engemann, K. Stegmaier, K. Schmitz und B. Schmidt

*J. Med. Chem.* **2019** 62 (5), 2428 – 2446.

<sup>#</sup> - Diese Autoren haben zu gleichem Anteil zur Veröffentlichung beigetragen.

Veröffentlichungen, die nicht im Kontext dieser Arbeit stehen:

### **Mutation-specific dual potentiators maximize rescue of CFTR gating mutants**

G. Veit, D. Da Fonte, R. Avramescu, A. Premchandrar, M. Bagdany, H. Xu, D. Bensinger, D. Stubba, B. Schmidt, E. Matouk and G. Lukacs

*J. Cystic Fibrosis* DOI: 10.1016/j.jcf.2019.10.011.

### **Xylochemistry – Making Natural Products Entirely from Wood**

D. Stubba, G. Lahm, M. Geffe, J. W. Runyon, A. J. Arduengo III, T. Opatz  
*Angew. Chem. Int. Ed.* **2015** 54, 14187-14189.

---

---

## Inhaltsverzeichnis

---

DANKSAGUNGEN .....	V
VERÖFFENTLICHUNGEN.....	VI
INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	IV
LISTE DER AMINOSÄUREN .....	X
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System .....	2
1.1.1. Die Polyubiquitylierung von Substratproteinen .....	2
1.1.2. Der proteosomale Proteinabbau .....	3
1.1.3. Das Immunoproteasom – Funktion und pharmakologische Bedeutung.....	6
1.1.4. Das Proteasom als Zielprotein in der Onkologie .....	7
1.1.5. Die Inhibition des 20S Proteasoms .....	9
1.1.6. Selektive Inhibitoren für das Immunoproteasom.....	15
1.2. Charakterisierung und Unterteilung von Leukämien.....	17
1.2.1. Klinische Symptome und Ursachen der AML.....	18
1.2.2. Therapieansätze der AML .....	19
1.2.3. Die FMS-like Tyrosinkinase 3 – FLT3 .....	20
1.2.4. Inhibition der FLT3 Kinase zur Therapie der AML.....	22
1.2.5. Die Verwendung kovalent-bindender Kinase-Inhibitoren .....	24
<b>2. AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>26</b>
2.1. Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und Evaluation von kovalent-reversibel bindenden Proteasom-Inhibitoren .....	26
2.2. Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und Evaluation von dual-kovalenten Inhibitoren für das Immunoproteasom.....	27
2.3. Synthese und Evaluation kovalent bindender FLT-3 Inhibitoren.....	27
<b>3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>28</b>
3.1. Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und pharmakologische Evaluation von kovalent-reversiblen Inhibitoren für das konstitutive Proteasom .....	28
3.1.1. Molekulare Modellierung von kovalent-reversiblen $\alpha$ -Ketoamid-Inhibitoren mit S1'- Selektivität.....	28
3.1.2. Synthese und biochemische Evaluation von $\alpha$ -Ketoamid-basierten Proteasom- Inhibitoren.....	31
3.1.2.1. Retrosynthese der Zielstrukturen.....	31

3.1.2.2.	Synthese der <i>ortho</i> -/ <i>meta</i> - und <i>para</i> Phenylether (55 – 57) .....	32
3.1.2.3.	<i>Passerini</i> -Reaktion und Oxidation zu den $\alpha$ -Ketoamiden (61 – 63) .....	33
3.1.2.4.	Biochemische Evaluation der Phenylether 61 – 63 als Proteasominhibitoren .....	35
3.1.2.5.	Synthese der Methyl-substituierten <i>meta</i> -Phenylether-Derivate 119 – 124.....	38
3.1.2.6.	Biochemische Evaluation der Methylderivate .....	41
3.1.2.7.	Optimierung des <i>N</i> -Terminus – Molekulare Modellierung und Synthese.....	43
3.1.2.8.	Biochemische Evaluation der verschiedenen <i>N</i> -Termini .....	45
3.1.2.9.	Synthese der Hybridstrukturen 142 – 145 .....	46
3.1.2.10.	Pharmakologische Evaluierung der Hybridstrukturen 142 – 145 .....	47
3.1.3.	Evaluierung von BSc5376 in <i>Danio rerio</i> Embryonen .....	54
3.1.3.1.	Evaluierung von BSc5376 im <i>Danio rerio</i> Toxizitätsassay .....	54
3.1.3.2.	Evaluierung von BSc5376 im <i>Danio rerio</i> Embryo Fluchtreflex-Assay .....	55
3.1.4.	Entwicklung kovalent-reversibler, fluoreszenter Proteasominhibitoren.....	58
3.1.4.1.	Strukturbasiertes Design der Fluoreszenzsonden.....	58
3.1.4.2.	Synthese der BODIPY-konjugierten Proteasom-Inhibitoren (151 – 153) .....	59
3.1.4.3.	Physikochemische und biochemische Evaluation von BODIPY-konjugierten Proteasom-Inhibitoren .....	60
<b>3.2.</b>	<b>Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und pharmakologische Evaluation von dual-kovalenten Immunoproteasom-Inhibitoren .....</b>	<b>63</b>
3.2.1.	Molekulare Modellierung von dual-kovalenten Immunoproteasom-Inhibitoren.....	63
3.2.2.	Synthese und biochemische Evaluation dual-kovalenter Immunoproteasom- Inhibitoren .....	65
3.2.2.1.	Retrosynthese der Zielstrukturen .....	65
3.2.2.2.	Synthese der dual-kovalenten $\alpha$ -Ketoamide 155 – 157 .....	66
3.2.2.3.	Pharmakologische Evaluierung der dual-kovalenten Immunoproteasom-Inhibitoren	69
<b>3.3.</b>	<b>Synthese und pharmakologische Evaluation von Bisaminopyrimidinen als irreversibel-bindende FLT3-Inhibitoren .....</b>	<b>71</b>
3.3.1.	Molekulare Modellierung und Identifikation der Leitstrukturen.....	71
3.3.2.	Retrosynthese der Zielstrukturen .....	76
3.3.3.	Synthese der Bisaminopyrimidin-basierten FLT3-Inhibitoren .....	76
3.3.4.	Pharmakologische Evaluation von Bisaminopyrimidinen als kovalent-bindende FLT3- Inhibitoren .....	79
3.3.5.	Weitergehende Evaluation der irreversibel bindenden FLT3-Inhibitoren .....	82
<b>4.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>87</b>
<b>4.1.</b>	<b>Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und pharmakologische Evaluation von kovalent-reversiblen Inhibitoren für das konstitutive Proteasom .....</b>	<b>87</b>
<b>4.2.</b>	<b>Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und pharmakologische Evaluation von dual-kovalenten Immunoproteasom-Inhibitoren .....</b>	<b>89</b>
<b>4.3.</b>	<b>Synthese und pharmakologische Evaluation von Bisaminopyrimidinen als kovalent-bindende FLT-3 Inhibitoren.....</b>	<b>90</b>
<b>5.</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>93</b>
<b>5.1.</b>	<b>Molekulare Modellierung .....</b>	<b>93</b>
5.1.1.	Strukturbasiertes Design von kovalent bindenden Proteasom-Inhibitoren .....	93



<b>5.2.</b>	<b>Organische Synthese .....</b>	<b>93</b>
5.2.1.	Allgemeine Methoden und Messgeräte .....	93
5.2.1.1.	Lösungsmittel und Chemikalien .....	93
5.2.1.2.	Destillationen.....	93
5.2.1.3.	Dünnschicht- und Säulenchromatographie.....	93
5.2.1.4.	NMR-Spektroskopie .....	94
5.2.1.5.	Massenspektrometrie .....	94
5.2.1.6.	HPLC-Analytik .....	95
5.2.1.7.	Mikrowellen-gestützte Synthese .....	95
5.2.2.	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	95
5.2.2.1.	Synthese von Diphenylethern via S <sub>N</sub> Ar (AAV1) .....	95
5.2.2.2.	Reduktion aromatischer Nitroverbindungen zu Aminen bzw. Cbz-Entschützung (AAV2).....	95
5.2.2.3.	Synthese aromatischer Formamide (AAV3) .....	95
5.2.2.4.	Synthese aromatischer Isonitrile (AAV4) .....	95
5.2.2.5.	Synthese von α-Ketophenylamiden (AAV5) .....	96
5.2.2.6.	Nitrierung von Anilinen (AAV6) .....	96
5.2.2.7.	Arylierung von Phenolen via Ph <sub>2</sub> ICl (AAV7) .....	96
5.2.2.8.	Synthese von Phenolen aus Anilinen (AAV8) .....	96
5.2.2.9.	Peptidsynthese via HATU (AAV9) .....	97
5.2.2.10.	Peptidsynthese via EDC und HOBt (AAV10) .....	97
5.2.2.11.	Oxidationen von Alkoholen via IBX (AAV11) .....	97
5.2.3.	Literaturbekannte Synthesen.....	97
5.2.4.	Darstellung der Inhibitoren für das konstitutive Proteasom .....	98
5.2.5.	Darstellung der Inhibitoren des Immunoproteasoms.....	142
5.2.6.	Darstellung der FLT3-Inhibitoren .....	152
5.2.7.	Bestimmung der Reinheit der getesteten Substanzen mittels HPLC .....	165
<b>5.3.</b>	<b>Pharmakologische Charakterisierung der Inhibitoren durch biochemische Methoden.....</b>	<b>167</b>
5.3.1.	Vorbereitung der verwendeten Inhibitoren .....	167
5.3.2.	Zelllinien.....	167
5.3.3.	Bestimmung der zeitabhängigen Zellviabilität.....	167
5.3.4.	Bestimmung der Inhibition von insoliertem Proteasom .....	167
5.3.5.	Bestimmung der zellulären Inhibition des Proteasoms .....	168
5.3.6.	Durchführung des Zebrafisch-Embryonen-Toxizitätsassays .....	168
5.3.7.	Bestimmung der Inhibition der Kinaseaktivität durch BSc5311 .....	169
5.3.8.	Dosis-Wirkungskurven .....	170
5.3.8.1.	IC <sub>50</sub> -Bestimmung der Inhibition des isolierten Proteasoms .....	170
5.3.8.2.	Zeitabhängige Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Proteasom-inhibitoren in verschiedenen Zelllinien .....	170
5.3.9.	Charakterisierung fluoreszenter Proteasom-Inhibitoren.....	173
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>		<b>175</b>
<b>ANHANG .....</b>		<b>I</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Å	Ångström
Ac	Acetyl
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Arbeitskreis
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AMC	Aminomethylcumarin
AML	Akute myeloische Leukämie
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
aq.	wässrig
ATP	Adenosintriphosphat
Bn	Benzyl
BODIPY	Dorondipyrromethen
br	<i>broad</i>
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
Btz	Bortezomib
c	Konzentration
Cbz	Benzyloxycarbonyl
cCP	Kernpartikel des konstitutiven Proteasoms
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
Cfz	Carfilzomib
°Hex	Cyclohexan
ChTL	<i>Chymotrypsin-like</i>
cKIT	Stammzellfaktor-Rezeptor
CL	<i>Caspase-like</i>

CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CP	<i>Core particle</i>
CRG	Chemisch-reaktive Gruppe
d	Dublett
Da	Dalton
DarT	<i>Danio rerio</i> Toxizitätsassay
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
dd	Dublett von Dublett
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-	Desoxyribonukleinsäure
dpf	Tage nach Fertilisation
DSX	<i>Drug Score eXtended</i>
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EI	<i>Electron ionization</i>
EL	<i>Elastase-like</i>
Em.	Emission
eq.	Equivalent

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESI	<i>Elektrospray ionization</i>
Et	Ethyl
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
Exc.	Exzitation
FLT3	<i>Fms-like tyrosin-kinase 3</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ges.	gesättigt
GK	<i>Gatekeeper</i> -Rest
GSH	Glutathion
GSK	Glykogen Synthase Kinase
h	Stunden
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium- hexafluorphosphat
HCV	Hepatitis-S-Virus
HDAC	Histon-Deacetylase
Her2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
hpf	Stunden nach Fertilisation
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HY	Hypothemycin
Hz	Hertz
IAA	2-Iodacetamid
IBX	2-Iodoxybenzoesäure

IC50	halb-maximale
iCP	Kernpartikel des Immunoproteasoms
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF $\kappa$ B
ITD	Interne Tandemdublikation
<i>J</i>	Kopplungskonstante
JAK2	Janus Kinase 2
JM	Juxtamambrandomäne
konz.	konzentriert
LMP	<i>Low-molecular mass protein</i>
Lsg.	Lösung
m	Multiplett
M	Mol pro Liter
<i>m</i>	<i>meta</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
Me	Methyl
MECL	<i>Multicatalytic endopeptidase complex like</i>
MeOH	Methanol
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOE	<i>Molecular Operating Environment</i>
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nM	Nanomolar
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie

<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	PDGF-Rezeptor
Ph	Phenyl
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLA2	Phospholipase A2
PPIase	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
ppm	<i>parts per million</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PyBoP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
PyBroP	Bromotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
q	Quartett
quant.	quantitativ
quin	Quintet
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
rel.	relativ
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
rfu	<i>relative fluorescence units</i>
RP	<i>regulatory particle</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS	Natriumdodecylsulfat
sept	Septett

---

SNAAP	<i>Small neutral amino acid preferring</i>
STAT5	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
SU	Sunitinib
t	Triplett
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
tBu	<i>tert</i> -Butyl
tCP	Kernpartikel des Thymusproteasom
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TK	Tyrosinkinase
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TL	<i>Trypsin-like</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor</i> -Rezeptor
yCP	Kernpartikel des Hefeproteasoms
$\delta$	chemische Verschiebung

---

## Liste der Aminosäuren

---

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V



---

## 1. Einleitung

---

Tumorerkrankungen zählen heutzutage nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zu der häufigsten Todesursache weltweit.<sup>[1]</sup> Im Jahre 2014 wurden alleine in Deutschland 476.120 Neuerkrankungen festgestellt und es wird damit gerechnet, dass mit fortschreitendem demographischen Wandel diese Zahl in naher Zukunft weiter steigen wird. Während bei Männern Prostatakrebs die häufigste Variante darstellt, wird bei Frauen das Auftreten von Brustkrebs am häufigsten beobachtet.<sup>[2]</sup> Eine Möglichkeit pharmakologisch zu intervenieren, stellt der Eingriff in den Proteinstoffwechsel dar.

Grundlegende Zellfunktionen wie Bewegung, Strukturgebung und die Signaltransduktion werden in Organismen durch den kontrollierten Auf- und Abbau von Proteinen gesteuert. Dabei ist die Proteinkonzentration in Zellen durch die Differenz zwischen der Geschwindigkeit der Proteinsynthese (Translation) und der Geschwindigkeit des Proteinabbaus (Proteolyse) definiert. Diese Homöostase zwischen Proteinauf- und -abbau ist somit ein essenzieller Bestandteil für das Zellüberleben.<sup>[3-4]</sup> Im Mittelpunkt des Proteinabbaus, der durch eine Vielzahl hochkomplexer, regulatorischer Prozesse geregelt wird, steht das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), dessen Entdeckung 2004 durch *Aaron Ciechanover*, *Irwin Rose* und *Avram Hershko* mit dem Nobelpreis in Chemie gewürdigt wurde.<sup>[5]</sup> Zentraler Bestandteil dieses Systems ist das 26S-Proteasom, wobei es sich um einen Multiprotease-Komplex handelt, der maßgeblich am kontrollierten Abbau von Proteinen zu Oligopeptiden im Cytosol und Zellkern eukaryotischer Zellen beteiligt ist.<sup>[6]</sup> Das UPS stellt neben dem lysosomalen Abbau den Hauptabbauweg von ca. 80% der zellulären Proteine dar. Dieser zentrale, hochspezifische Prozess ist in der Lage, fehlerhafte Proteine aus dem Cytosol und dem endoplasmatischen Retikulum zu entfernen. Des Weiteren spielt der zeitlich kontrollierte und hochregulierte Abbau von Schlüsselproteinen, wie Zellzyklusregulatoren und Transkriptionsfaktoren, eine entscheidende Rolle bei der Regulation diverser zellulärer Funktionen. Weitere Prozesse, auf die das UPS Einfluss nimmt, sind die Zellzyklusregulation,<sup>[7]</sup> die DNA-Reparatur,<sup>[8]</sup> die Apoptose,<sup>[9]</sup> Immunreaktionen und Entzündungsprozesse<sup>[10-11]</sup> sowie monogenetische Erkrankungen, wie beispielsweise die zystische Fibrose.<sup>[12]</sup> Neben den genannten Anwendungsgebieten, wurde das UPS als vielversprechendes Ziel in der Tumorthherapie identifiziert, da Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Zellen deutlich empfindlicher gegenüber einer Inhibition des UPS sind.<sup>[13]</sup> So kann beispielsweise durch gezielte Inhibition eine Stabilisierung von Proteinen erreicht werden, die zur Apoptose von Tumorzellen führen. Die Herausforderung liegt dabei in einer Inhibition ohne Beeinträchtigung notwendiger physiologischer Funktionen, die nicht-tolerierbare Nebenwirkungen auslösen. Diese Strategie führte bis dato zu drei zugelassenen Inhibitoren für das Proteasom, die zur Behandlung des Multiplen Myeloms<sup>[14]</sup> und des Mantelzelllymphoms genutzt werden.<sup>[15]</sup> Da es zum einen bei den aktuellen Behandlungen jedoch noch zu dosislimitierenden Nebenwirkungen sowie dem Auftreten von Resistenzen kommt und zum anderen die Wirkung noch auf Neoplasien des blutbildenden Systems beschränkt ist, sind Proteasominhibitoren weiterhin Gegenstand intensiver Forschung.<sup>[4]</sup>

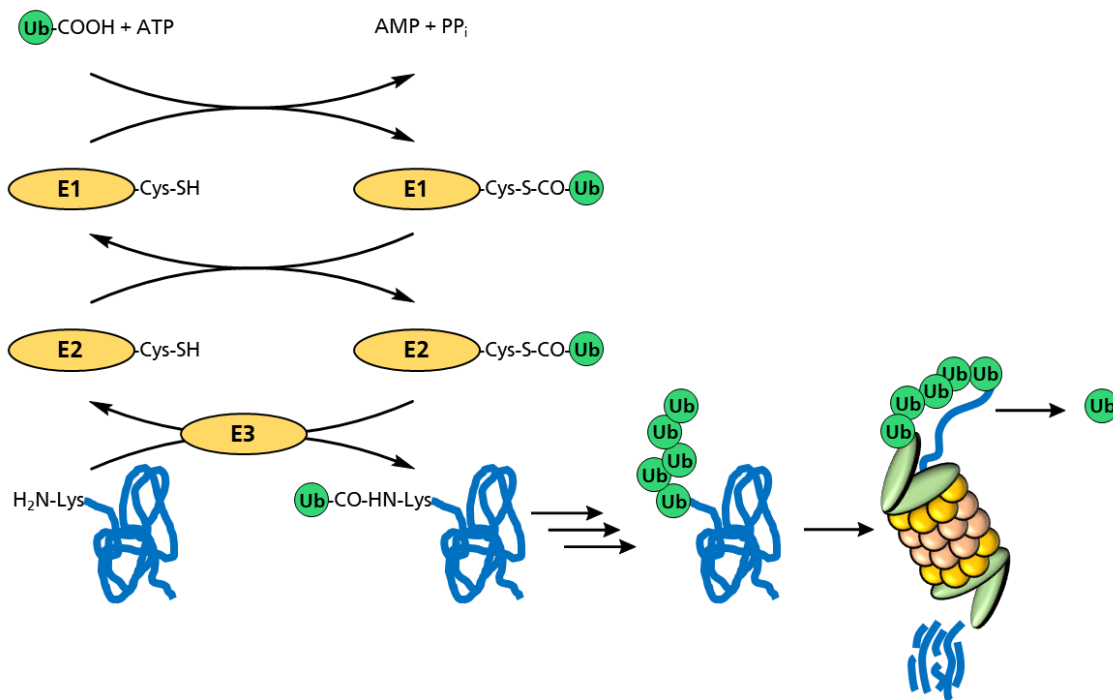
Der kontrollierte Proteinabbau kann in zwei elementare Schritte unterteilt werden: Die Markierung der abzubauenen Proteine durch eine Polyubiquitinkette und den darauffolgenden Abbau der markierten Proteine durch das 26S-Proteasom.<sup>[5]</sup> Diese Prozesse sowie die pharmakologische Bedeutung werden im Folgenden näher erläutert.

## 1.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist verantwortlich für die kontrollierte nicht-lysosomale Proteolyse in eukaryotischen Zellen und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase sowie der Regulierung verschiedenster Prozesse. Ausschlaggebend ist zunächst die ATP-abhängige Markierung des abzubauenden Proteins mit einer Polyubiquitinkette, wodurch anschließend der Abbau der polyubiquitylierten Proteine durch das 26S-Proteasom sowie die Freisetzung von Ubiquitin erfolgt. Abbildung 1 stellt eine schematische Darstellung des UPS mit den beiden ausschlaggebenden Prozessen dar.<sup>[5]</sup>

### 1.1.1. Die Polyubiquitylierung von Substratproteinen

Das aus 76 Aminosäuren bestehende Ubiquitin (Ub) ist mit einer Masse von 8 kDa ein relativ kleines Protein und verdankt seinen Namen seinem „ubiquitären“ Vorkommen in nahezu allen Organismen. Für die Ubiquitylierung wird Ub über sein C-terminales Glycin isopeptidisch an freie Lysin-Seitenketten von Substratproteinen gebunden. Auf diese Weise dient es als Signal zum Abbau markierter Proteine durch das UPS oder es reguliert wichtige Prozesse, wie Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur oder Apoptose. Die Anknüpfung von Ub an das Substratprotein erfolgt über eine Kaskade, an der drei Enzymen beteiligt sind.<sup>[16]</sup>



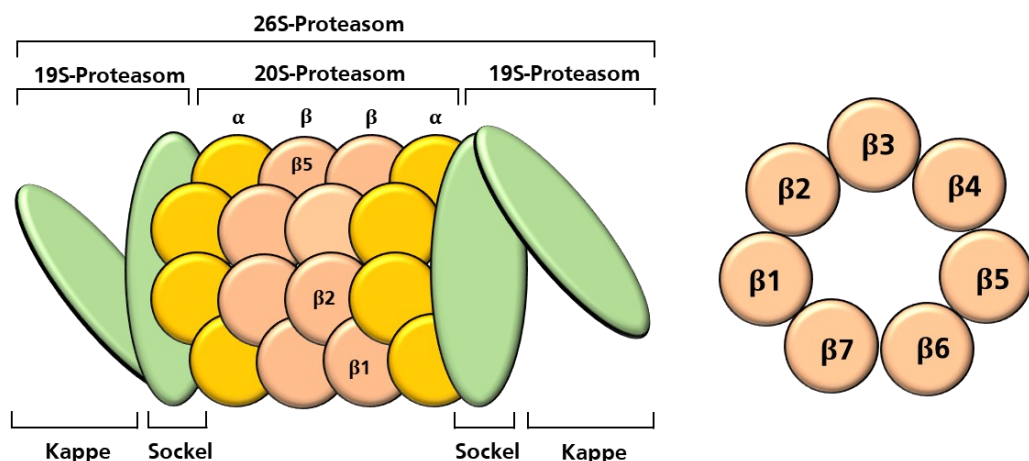
**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der ATP-abhängigen Polyubiquitylierung abzubauender Proteine, anschließender Abbau in Oligopeptide und Freisetzung von Ubiquitin durch das 26S-Proteasom. Modifizierte Abbildung nach Biel et al.<sup>[16]</sup>

Im Auftaktschritt wird Ub unter ATP-Verbrauch durch eine hochenergetische Thioesterbindung auf eine Cystein-Seitenkette des Ub-aktivierenden Enzyms E1 übertragen. Anschließend erfolgt eine Umesterung auf eine Cystein-Seitenkette des Ub-konjugierenden Enzyms E2. Das aktivierte Ub wird im folgenden Schritt durch eine, für das jeweilige Substratprotein hochspezifische, Ub-Ligase E3 auf eine  $\epsilon$ -Aminogruppe des Substratproteins übertragen und über eine Isopeptidbindung verknüpft. Da Ub selbst über zwei exponierte Lysin-Seitenketten (Lys48 und

Lys63) verfügt, kann die Reaktionskaskade mehrfach wiederholt werden, was schließlich zu einer Polyubiquitylierung des Substratproteins führt. Je nach Art und Grad der Ub-Verknüpfung kann dies zu einer Signaltransduktion oder Interaktion mit anderen Proteinen führen, oder als Signal für den Abbau durch das Proteasom dienen.<sup>[16-17]</sup> Die Proteolyse, die Struktur des 26S-Proteasoms und dessen Funktionsweise werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

### 1.1.2. Der proteosomale Proteinabbau

Das Proteasom, dessen Hauptaufgabe der Abbau von fehlgefalteten, beschädigten oder überflüssigen Proteinen ist, ist hauptsächlich im Zytoplasma, aber auch im Zellkern lokalisiert, jedoch mit einer geringeren Häufigkeit. Bei dem 26S-Proteasom handelt es sich um einen 2.5 MDa schweren, multikatalytischen Threonin-Protease-Komplex, der aus dem 20S-Kernpartikel (*core particle*, CP) und zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten (*regulatory particle*, RP) besteht (siehe Abbildung 2).<sup>[18-19]</sup> Das ca. 900 kDa schwere 19S-Proteasom übernimmt regulatorische Funktionen und besitzt sowohl eine Isopeptidase-Aktivität als auch eine Polyubiquitin-Bindungsstelle. Es lässt sich weiter in die Basis mit 10 weiteren Untereinheiten sowie die Kappe mit 9 Untereinheiten aufteilen. Die wichtigste enzymatische Aktivität der Kappe besitzt Rpn11, das für die Deubiquitylierung verantwortlich ist.<sup>[4]</sup> Abzubauen polyubiquitylierte Proteine werden durch den RP erkannt, deubiquityliert und entfaltet. Anschließend leitet der RP die entfaltenen Proteine in das 20S-Proteasom, wo es zum Abbau der Proteine zu Oligopeptiden kommt. Ist die Zelle oxidativem Stress ausgesetzt, dissoziiert der 26S-Komplex, indem die RP abgespalten werden und das CP somit ungebunden vorliegt. Dies befähigt das CP, die oxidierten, geschädigten Proteine in einem ATP-Ub-unabhängigen Prozess abzubauen.<sup>[3, 6]</sup> Neben dem 19S-RP sind noch der PA200 Regulator bekannt, der im Zellkern auftritt, und der PA28 Regulator, der auch als 11S-RP bezeichnet wird, der in Unterformen im Zellkern sowie im Zytoplasma vorkommt. Beide Regulatoren gelten als Aktivatoren für einen Substratabbau auf einem ATP- und Ub-unabhängigen Weg, wobei deren Regulation und Funktionsweise noch nicht vollständig aufgeklärt sind.<sup>[20-21]</sup>

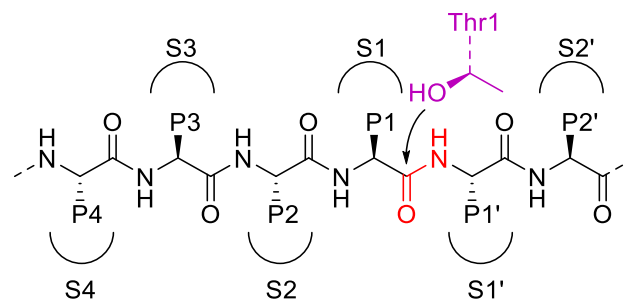


**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des 26S-Proteasoms, bestehend aus dem katalytisch aktiven 20S-Proteasom und zwei 19S-Untereinheiten. Das 20S-Proteasom besteht aus jeweils zwei heptameren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ring (links). Darstellung der 7 Untereinheiten der  $\beta$ -Ringe, wobei  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  katalytisch aktiv sind (rechts). Modifizierte Abbildung nach *Cromm et al.*<sup>[4]</sup>

Bei dem 20S CP handelt es sich um einen ca. 700 kDA schweren, aus 28 Untereinheiten bestehenden Hohlzylinder mit einer Länge von ca. 160 Å und einem Durchmesser von ca. 120 Å. Der Proteinkomplex besteht aus jeweils zwei heptameren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringen, wodurch sich eine 72-Punktsymmetrie ergibt.<sup>[6]</sup> Der CP beinhaltet insgesamt sechs katalytisch-aktive Zentren mit drei unterschiedlichen Substratspezifitäten ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$ ).<sup>[22]</sup>

Bis dato wurden vier verschiedene Proteasomtypen entdeckt. Das konstitutive Proteasom (cCP), das Immunoproteasom (iCP), das Thymusproteasom (tCP) und das Spermatoproteasom.<sup>[23]</sup> Das cCP kommt in sämtlichen Gewebetypen, das iCP hauptsächlich in Mono- und Lymphozyten, das tCP lediglich in kortikalen Epithelzellen des Thymus und das Spermatoproteasom ausschließlich in den Hoden vor.<sup>[23]</sup> Das cCP ist am generellen Abbau von Proteinen in sämtlichen Zellen beteiligt, während das iCP Antigene produziert, die von MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse-I-Rezeptoren gebunden und an der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese können von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, was zu einem Abtöten der entsprechenden Zellen führt. Das tCP liefert Spaltprodukte, die für die Entwicklung zytotoxischer T-Zellen benötigt werden und das Spermatoproteasom ist an der Differenzierung von Spermatogonien zu den reifen Keimzellen beteiligt. Hierbei handelt es sich um einen hochgradig regulierten zellulären Prozess, der Mitose, Meiose und morphologische Veränderungen beinhaltet, die möglicherweise alle von der proteosomalen Aktivität abhängig sind.<sup>[23-24]</sup> Die verschiedenen Proteasomtypen unterscheiden sich vor allem in der Zusammensetzung der katalytischen Untereinheiten. Während im cCP die  $\beta 1c$ -,  $\beta 2c$ -, und  $\beta 5c$ -Untereinheiten die katalytisch aktiven Zentren bilden, sind diese im iCP durch  $\beta 1i$  (LMP2),  $\beta 2i$  (MECL-1) und  $\beta 5i$  (LMP7) ersetzt. Das tCP besitzt die aktiven Untereinheiten  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  und  $\beta 5t$ . Die genaue Zusammensetzung der Untereinheiten im Spermatoproteasom ist weiterhin Gegenstand intensiver Forschung.<sup>[4, 24-25]</sup> Die genauere Funktion und pharmakologische Bedeutung des Immunoproteasoms werden in Abschnitt 1.1.3. näher behandelt.

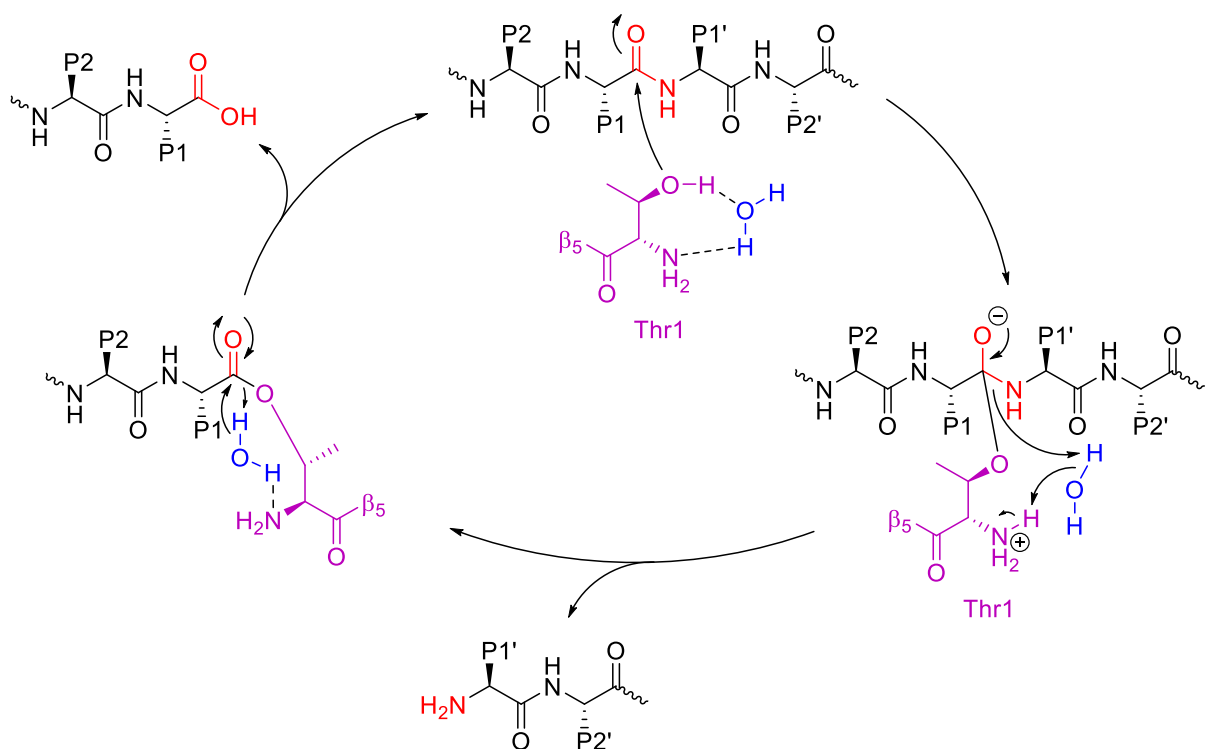
Die Substratspezifität wird durch die Struktur der Substratbindetasche des katalytisch aktiven Zentrums definiert, die von der Schnittstelle ausgehend, in N-terminaler Richtung des Substrats mit S1–S4 und in C-terminaler Richtung mit S1'–S2' bezeichnet werden (siehe Abbildung 3). Die entsprechenden Aminosäureseitenketten werden mit P1–P4 bzw. P1'–P2' definiert. Für die Selektivität sind nach heutigem Kenntnisstand überwiegend die Substratbindetaschen S1 und S3 entscheidend. Da die S2 Bindetasche sehr groß ist kann diese somit selbst sterisch äußerst anspruchsvolle Seitenketten der Substrate aufnehmen.<sup>[6]</sup>



**Abbildung 3:** Nomenklatur des Substratbindekanals: Es wird zwischen der gestrichenen Seite (Bindetaschen S1'–S2' in C-terminaler Richtung, ausgehend von der Schnittstelle) und der nicht-gestrichenen Seite (S1–S4 Bindetaschen) unterschieden. Die Spaltung der Peptidbindung (rot) erfolgt durch das katalytische Thr1 (violett). Die entsprechenden Aminosäureseitenketten werden mit P1–P4 bzw. P1'–P2' definiert.<sup>[26]</sup>

Die Substratspezifität und die damit bevorzugte Spaltpräferenz der verschiedenen katalytisch aktiven Untereinheiten werden maßgeblich durch die Struktur der S1-Bindetasche bestimmt, welche vor allem durch die Aminosäureseitenkette an Position 45 definiert wird. In der  $\beta$ 1-Untereinheit ist Arg45 besonders gut geeignet, um Wechselwirkungen mit sauren Aminosäuren einzugehen, weshalb eine Caspase-ähnliche Aktivität (CL) beobachtet werden kann. Die S1-Tasche der  $\beta$ 2 Untereinheit wird durch Gly45 relativ groß und durch Wechselwirkungen mit der Seitenkette von Glu53 werden große und basische Reste in P1 bevorzugt, was zu einer Trypsin-ähnlichen Aktivität (TL) führt. Die Klassifizierung der  $\beta$ 5 Untereinheit als Chymotrypsin-ähnlich (ChTL) erfolgt durch die konformationell überaus flexible Seitenkette von Met45. Es kommt demnach zu einer Spaltung von Peptidbindungen nach neutralen, hydrophoben Aminosäuren. Da es bevorzugt auch zu einer Spaltung nach kleinen, neutralen Aminosäuren (SNAAP) kommt, kann die  $\beta$ 5-Untereinheit auch als Elastase-ähnlich (EL) beschrieben werden.<sup>[6, 27]</sup>

Die katalytisch aktiven Untereinheiten des 20S-Proteasoms zeigen einen für Proteasen seltenen Hydrolysemechanismus, der bei allen aktiven Untereinheiten einheitlich verläuft. Im Zentrum des Mechanismus steht als nukleophile Seitenkette ein N-terminales Threonin (Thr1), dessen Hydroxylgruppe die Amidbindung nukleophil angreift, während es durch das terminale Amin sowohl zu einer Koordination als auch einer Aktivierung eines Wassermoleküls kommt. Der genaue Mechanismus ist in Schema 1 dargestellt.<sup>[22]</sup>



**Schema 1:** Hydrolysemechanismus der Proteine zu Oligopeptiden durch das katalytisch aktive Thr1 (lila). Nach dem nukleophilen Angriff kommt es zur Freisetzung des N-terminalen Peptidfragments und anschließend zur Hydrolyse und Abspaltung des C-terminalen Fragments, wobei das katalytisch aktive Thr1 regeneriert wird. Modifizierte Abbildung nach Kisselev *et al.*<sup>[22]</sup>

Im Auftaktschritt greift die Hydroxylgruppe des N-terminalen Thr1 (Thr1Oy) die zu schneidende Peptidbindung des Substratproteins nukleophil an. Dieser Angriff wird durch den freien Amin-Terminus (Thr1N) ermöglicht, indem durch die Koordination eines Wassermoleküls die Nukleophilie der Hydroxylgruppe deutlich erhöht wird. Aus dem entstandenen tetraedrischen

---

Intermediat wird anschließend das N-terminale Peptidfragment durch Protonentransfer freigesetzt. Die folgende Hydrolyse des verbleibenden Acylesters liefert die C-terminale Komponente und das katalytisch aktive Thr1 wird regeneriert. [22]

Der genannte Mechanismus wird anschließend mehrfach durchlaufen. Das Substratprotein verlässt den Proteasomkomplex nicht, bevor es vollständig zu Fragmenten von einer Länge zwischen drei und 25 Aminosäuren abgebaut wurde. Hierbei ist die durchschnittliche Länge der Spaltprodukte unabhängig von der Anzahl der umgebenden aktiven Zentren und beträgt 7 bis 8 Aminosäuren. Ein weiterer Abbau der erzeugten Oligopeptide erfolgt teilweise durch Peptidasen, was dem Organismus freie Aminosäuren als neue Bausteine zur Verfügung stellt. Wie bereits beschrieben, können die Oligopeptide aber auch als T-Zell-Antigene in MHC-Klasse-I-Komplexen dienen, was vornehmlich basische oder hydrophobe Spaltprodukte der  $\beta$ 2- sowie  $\beta$ 5-Untereinheit betrifft. [28]

### 1.1.3. Das Immunoproteasom – Funktion und pharmakologische Bedeutung

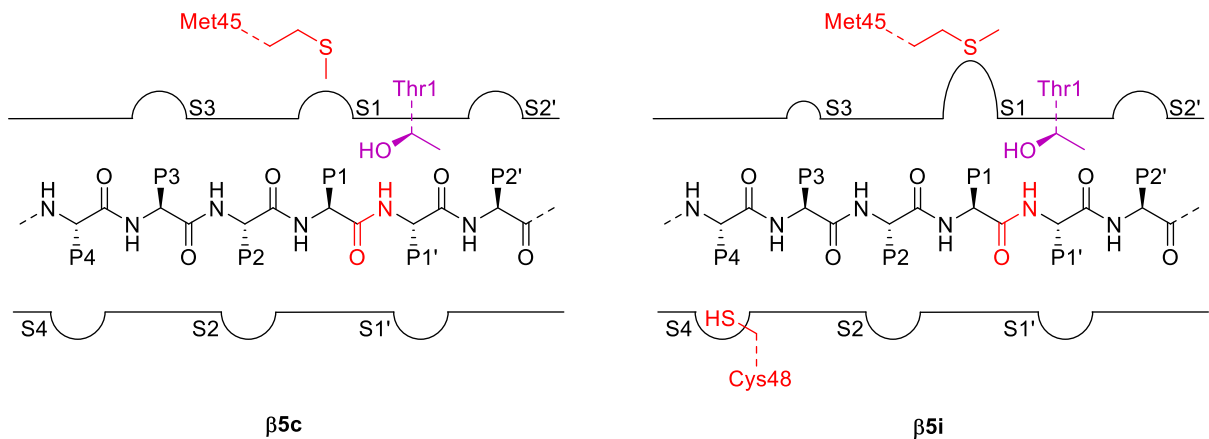
Das Immunoproteasom stellt, wie bereits beschrieben, einen besonderen Subtyp des Proteasoms dar und wird überwiegend in Zellen, die mit dem Immunsystem assoziiert sind, exprimiert. Im Zuge von Entzündungsreaktionen kann es allerdings auch durch die Induktion mittels Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) zu einer Expression in anderen Gewebszellen kommen. Bei der verstärkten Zytokin-induzierten Expression des iCP kommt es interessanterweise auch zu einer vermehrten Bildung des 11S-RP. Zusätzlich wird die Affinität des 20S-CP zum 19S-RP verringert, wodurch das iCP hauptsächlich als 11S-20S-11S-Komplex vorliegt, wobei der 11S-RP vermutlich an der gesteigerten proteolytischen Aktivität des iCP beteiligt ist. [29-30] Die Spaltung von Proteinen durch das iCP erfolgt bevorzugt zu Oligopeptiden mit einem hydrophoben C-Terminus und einer Kettenlänge von 8 – 10 Aminosäuren. Die generierten Peptidfragmente werden anschließend durch TAP-Transporter in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert, wo sie auf MHC-Klasse-I-Rezeptoren geladen werden und anschließend an der Zelloberfläche präsentiert werden. Dort werden sie von zytotoxischen T-Zellen, genauer den CD8<sup>+</sup> T-Zellen, erkannt, wodurch eine Immunantwort ausgelöst wird. [31] Durch diesen Mechanismus ist eine Erkennung von beschädigten oder viral-befallenen Zellen durch das Immunsystem möglich, wodurch die betroffenen Zellen abgetötet werden können. [26] Um diese Funktionen möglichst effektiv erfüllen zu können, weist das iCP im Vergleich zum cCP neben einer gesteigerten proteolytischen Aktivität eine schnellere Expressionsrate und eine geringere Halbwertszeit auf. Daneben spielt das Immunoproteasom eine zentrale Rolle für das Überleben sowie das Wachstum von T-Zellen, der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, der Differenzierung von T-Helferzellen und bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. [10, 25, 32] Aufgrund der zentralen Rolle im Immunsystem stellt das Immunoproteasom ein vielversprechendes Ziel für die Behandlung verschiedener Immunerkrankungen dar. So kann zum Beispiel der selektive  $\beta$ 5i Inhibitor **ONX0914 (18)** eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen unterdrücken, wobei eine Dosis ausreicht, die weit unterhalb der maximal tolerierbaren Dosis liegt. [33]

Weitere erste Erfolge durch eine gezielte und modulierte Inhibition des iCPs und eine damit einhergehende Immunmodulation konnten in Mausmodellen von Autoimmunerkrankungen, vor allem der Multiplen Sklerose, Morbus Crohn, Lupus, der rheumatoiden Arthritis, Diabetes, und der Hashimoto-Thyreoiditis erzielt werden. [33-38] Erhöhte Expressionslevel an iCP wurden

auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, der Makuladegeneration oder Chorea Huntington beobachtet.<sup>[39-41]</sup> Da eine Vielzahl von Krankheitsbildern Entzündungen einschließt, sind der genaue physiologische Einfluss des iCP sowie die potenziellen Auswirkungen einer selektiven Inhibition noch Gegenstand intensiver Forschung. Ebenfalls scheint eine Inhibition des iCP eine mögliche Strategie zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen, wie dem Multiplen Myelom, Dickdarm-, Prostata- oder Lungenkrebs zu sein.<sup>[37, 42-43]</sup>

Die veränderten Spaltpräferenzen des iCP gegenüber dem cCP bzw. dem tCP entstehen durch strukturelle Unterschiede der katalytischen Untereinheiten. Das Auftreten unterschiedlicher Proteinfragmente erklärt somit auch die unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen Proteasomtypen. Die veränderte Substratspezifität der  $\beta$ 1i von sauren zu verzweigten Aminosäureresten führt dazu, dass die entstehenden Oligopeptide besser an MHC-I-Komplexe binden können. Auch eine Vergrößerung der S1-Tasche in der  $\beta$ 5i-Untereinheit sorgt für die bevorzugte Generierung von Fragmenten für die Antigenpräsentation, indem bevorzugt nach sterisch anspruchsvollen, hydrophoben Aminosäureseitenketten gespalten wird.<sup>[44]</sup>

Die genannte Vergrößerung der S1-Bindetasche der  $\beta$ 5i-Untereinheit erfolgt durch einen Austausch von Ser53 zu Gln53, wodurch eine Umorientierung von Met45 ermöglicht wird, die zu der Vergrößerung der Tasche führt. Die S3-Tasche hingegen ist in der  $\beta$ 5i-Untereinheit deutlich kleiner als in der  $\beta$ 5c-Untereinheit. Des Weiteren tritt in der S4-Tasche von  $\beta$ 5i ein freies Cystein (Cys48) auf, welches neben Thr1 die Möglichkeit eines kovalenten Angriffs durch ein Elektrophil darstellt (vergleiche Abbildung 4). Die genannten Änderungen bieten somit mögliche Ansatzpunkte für das Design von Inhibitoren, die eine starke Selektivität für die  $\beta$ 5i- gegenüber der  $\beta$ 5c-Untereinheit aufweisen.<sup>[4, 15]</sup>



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Substratbindekanals der  $\beta$ 5-Untereinheit des cCP (links) und des iCP (rechts). Die S1-Bindetasche des iCP ist durch eine Reorientierung von Met45 vergrößert. Zusätzlich ist Cys48 in der S4-Bindetasche des iCP zugänglich. Modifizierte Abbildung nach *Cromm et al.*<sup>[4]</sup>

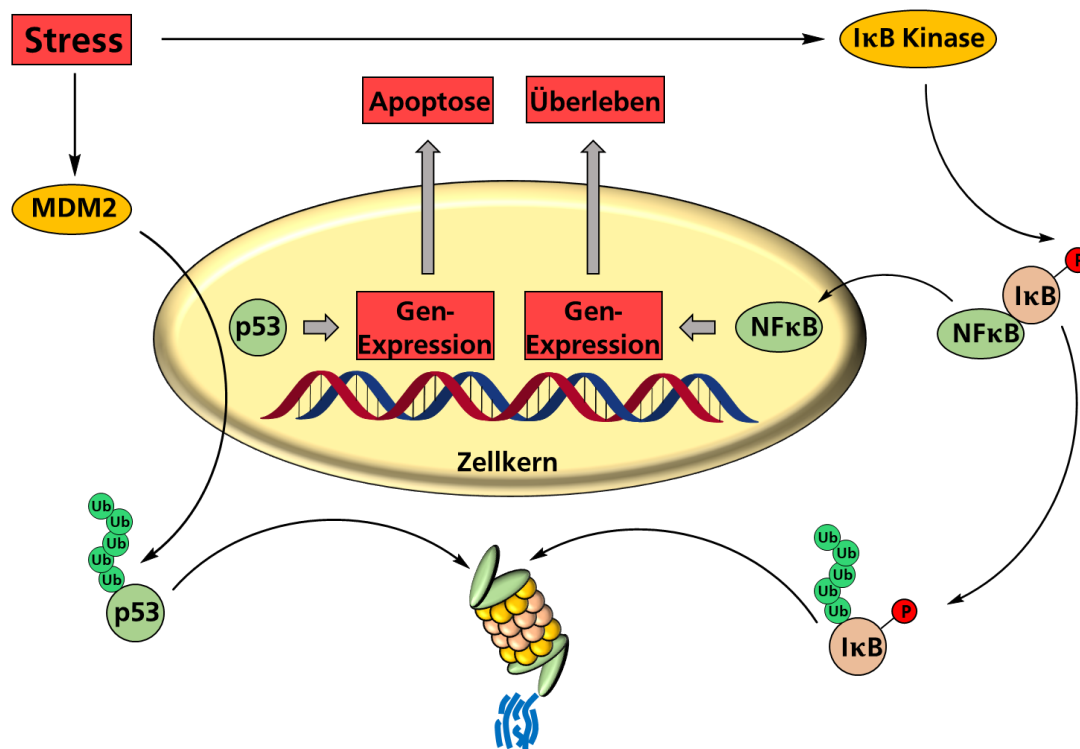
#### 1.1.4. Das Proteasom als Zielprotein in der Onkologie

Wie bereits beschrieben wird durch das UPS eine Vielzahl physiologischer Prozesse reguliert. Bei der Proteinqualitätskontrolle einer gesunden Zelle werden bis zu 30% der neu synthetisierten Proteine als schadhaft erkannt, ubiquitinyliert und vom Proteasom abgebaut.<sup>[45]</sup> In Tumorzellen ist die Substratumsetzung aufgrund der erhöhten Teilungsrate sowie dem gesteigerten Metabolismus erheblich gesteigert, was diese Zellen deutlich anfälliger für eine reduzierte Proteasomaktivität macht. Kommt es zu einer übermäßigen Anhäufung von



Proteinen, die abgebaut werden sollen, dient dies schlussendlich als Signal für die Zelle in die Apoptose einzutreten. Die molekularen Grundlagen hierfür sind in Abbildung 5 dargestellt und werden im Folgenden erläutert.<sup>[16]</sup>

Kommt es innerhalb einer Zelle zu einem stressinduzierten DNA-Schaden, so werden Tumorsuppressorproteine, wie beispielsweise p53 und p27 exprimiert, was zu einem Zellzyklusarrest führt, der bis zur Behebung des Schadens durch intrazelluläre Reparaturmechanismen aufrechterhalten wird. Zellulärer Stress kann hierbei durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden, wie beispielsweise: durch Zytokine, Reaktive Sauerstoffspezies, Viren oder ionisierende Strahlung. Ist eine Reparatur der DNA nicht möglich, kommt es zu einer vermehrten Expression von p53, dessen Akkumulation die Apoptose der geschädigten Zellen induziert. Somit verhindert p53, das auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird, die Zellteilung bei geschädigter DNA. Die Inaktivierung von p53 in gesunden Zellen gilt als universeller Schritt für die Entstehung von malignen Tumoren.<sup>[46]</sup> Der Abbau von p53 geschieht über die auf p53 spezialisierte Ub-Ligase MDM2, die Ub auf p53 überträgt und somit dessen Abbau durch das Proteasom einleitet. Neben p53 spielt der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Krebs. Steht die Zelle unter Stress, wird das Substrat der I $\kappa$ B-Kinase, der NF- $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B, phosphoryliert, was zu dessen Ubiquitylierung durch eine E3-Ligase führt. Der anschließende proteosomale Abbau von I $\kappa$ B führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, das daraufhin in den Zellkern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen erhöht. Hierbei handelt es sich um Genprodukte die für die Regulierung verschiedener Signalwege verantwortlich sind und die dazu führen, dass die Zelle trotz DNA-Schaden überleben kann. Insbesondere der Einfluss auf diese NF- $\kappa$ B-vermittelten Signalwege macht die Inhibition des Proteasoms zu einer vielversprechenden Therapiestrategie, nicht nur für die Tumorthherapie, sondern auch für Autoimmunerkrankungen.<sup>[16]</sup>



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege, die mit dem Proteasom in Verbindung stehen. Vor allem das Tumorsuppressorprotein p53 und der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B sind durch eine Inhibition des Proteasoms interessante Ansatzpunkte für Therapien in der Onkologie. Modifizierte Abbildung nach Biel *et al.*<sup>[16]</sup>



---

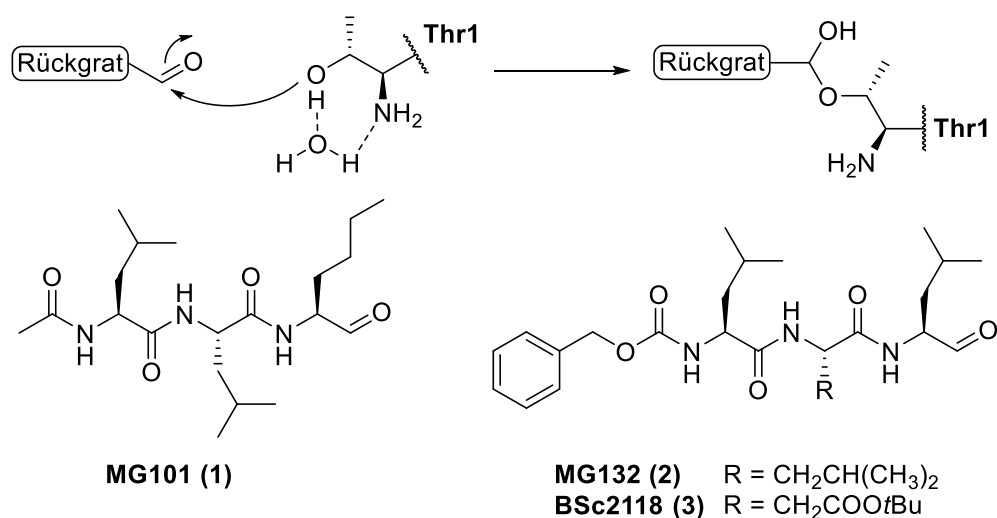
### 1.1.5. Die Inhibition des 20S Proteasoms

Die in Abschnitt 1.1.4. beschriebenen Auswirkungen einer Inhibition des Proteasoms in Tumorzellen motivieren zur Entwicklung von Inhibitoren für die Behandlung von Tumorerkrankungen. Da das Proteasom allerdings eine äußerst wichtige Rolle bei nahezu allen zellulären Prozessen spielt, wurde lange Zeit angezweifelt, ob eine Inhibition eines solch zentralen Proteins sich überhaupt für einen Therapieansatz eignet.<sup>[5]</sup> Allerdings sind die meisten zellulären Prozesse wiederum stark reguliert, wobei bereits kleine Änderungen in der Protein-Homöostase oft zu signifikanten biochemischen Änderungen führen. Somit wurde angenommen, dass eine Restaktivität des Proteasoms von 40–60% die gewünschten Effekte auslösen kann, ohne gleichzeitig unspezifische zytotoxische Nebenwirkungen zu erzeugen. Bestätigt wurde dies bei Untersuchungen mit dem Proteasom-Inhibitor **Argyrin**, der die proteosomale Aktivität reduziert, ohne signifikante zytotoxische Nebenwirkungen zu verursachen. **Argyrin** führt außerdem zur Stabilisierung der Konzentration des Cyclin-Kinase-Inhibitors p27 und induziert dadurch selektiv die Apoptose in Tumorzellen. Durch die erhöhte Aktivität des Proteasoms in Tumorzellen, im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen, reagieren diese deutlich empfindlicher auf eine Inhibition des Proteasoms. Als besonders effektiv hat sich dabei die Inhibition der  $\beta 5$ -Untereinheit herauskristallisiert.<sup>[47-48]</sup>

Die enormen Anstrengungen, die seitdem für die Entwicklung von Proteasom-Inhibitoren unternommen wurden, haben bisher zur Zulassung von drei Wirkstoffen zur Behandlung verschiedener, nicht-solider Tumorerkrankungen geführt. Die Inhibitoren sind in ihrer Struktur an ein peptidisches Substrat angelehnt und bilden eine kovalente Bindung mit Thr1O $\gamma$  der  $\beta 5$ -Untereinheit über eine elektrophile Gruppe aus. Die Selektivität und die Bindungsstärke wird hierbei durch die Reste der Aminosäureseitenketten des Peptidrückgrats bestimmt, die die Spezifitätstaschen des Substratbindekanals besetzen. Somit kann eine Selektivität zwischen den verschiedenen Proteasomfamilien sowie einzelnen Untereinheiten erreicht werden. Die Besetzung der Bindetaschen findet typischerweise auf der ungestrichenen Seite des Substratbindekanals statt. Eine Adressierung der gestrichenen Seite wird nur durch wenige, experimentelle Inhibitoren erreicht, beispielsweise durch die in dieser Arbeit verwendeten  $\alpha$ -Ketophenylamide. Weiterhin werden die Inhibitoren nach ihrem Bindemodus klassifiziert. Dabei unterscheidet man zwischen reversibel- oder irreversibel- und kovalent- oder nicht-kovalent bindend. Des Weiteren wird zwischen peptidischen, peptoiden und nicht peptidischen Inhibitoren differenziert. Neben den zugelassenen Wirkstoffen sind weitere elektrophile Kopfgruppen, zahlreiche Naturstoffe sowie Immunoproteasom-spezifische Inhibitoren Gegenstand intensiver Forschung für verschiedenste Indikationen. In diesem Abschnitt werden die vielversprechendsten Inhibitorklassen anhand deren bedeutendster Vertreter vorgestellt.<sup>[4, 22, 38]</sup>

Zu Beginn der Erforschung von Proteasom-Inhibitoren war zunächst noch nicht bekannt, um welche Klasse von Proteasen es sich dabei handelte. Deshalb wurden erste Experimente mit einer Vielzahl von bekannten Inhibitoren für Cystein- und Serinproteasen durchgeführt. Dabei wurde die Klasse der peptidischen Aldehyde identifiziert, die gegenüber dem Proteasom eine inhibitorische Aktivität aufweist. Der Beweis, dass es sich um eine Threonin-Protease handelt, bei der der Inhibitor kovalent reversibel mit dem aktiven Threonin verbunden ist, gelang 1995 durch die Aufnahme der Kristallstruktur des Calpain-Inhibitors I, **MG101 (1)**, im Komplex mit dem CP des Archaeon *Thermoplasma acidophilum*.<sup>[49-50]</sup> Diese Kristallstruktur stellte den Startpunkt für ein rationales Inhibitor-design dar, um selektive Inhibitoren für das CP zu entwickeln. Für die Bindungsbildung greift das aktive Thr1O $\gamma$  die Aldehyd-Kopfgruppe an,

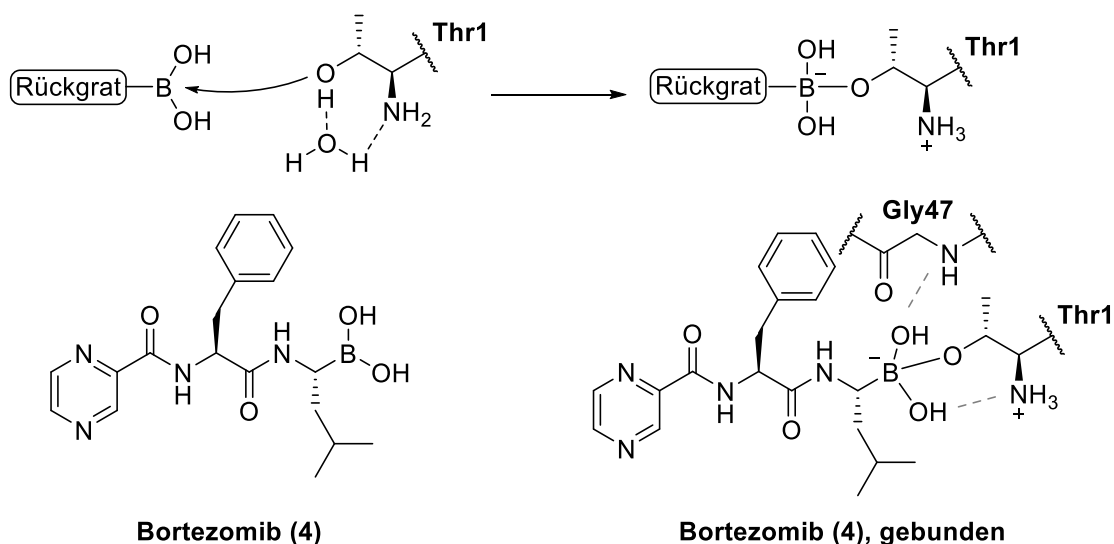
wodurch ein Halbacetal ausgebildet wird (siehe Abbildung 6). Weitere Anstrengungen auf diesem Gebiet führten zu dem noch heute *in vitro* vielfach verwendeten Peptidaldehyd **MG132 (2)**, das eine potente und halbwegs selektive Inhibition des  $\beta 5$ -Untereinheit verursacht, jedoch ebenfalls  $\beta 2$  und  $\beta 1$  inhibiert. Das von **MG132 (2)** abgeleitete Derivat **BSc2118 (3)**, das in der Arbeitsgruppe von *B. Schmidt* entwickelt wurde, stellt bis heute einen der potentesten und selektivsten Vertreter dieser Substanzklasse dar. Da die  $\beta 5$ -Untereinheit des Proteasoms keine spezifische S2-Tasche aufweist, kann der sterisch anspruchsvolle Asp(OtBu)-Rest in P2 von **BSc2118 (3)** in den inneren Kanal des Kernkomplexes hineinragen. Dieser raumfüllende Rest in P2 verleiht einen Selektivitätsvorsprung gegenüber anderen Proteasen im Vergleich mit **MG132 (2)**.<sup>[6, 51]</sup> Für den klinischen Gebrauch sind die peptidischen Aldehyde jedoch weniger geeignet. Sie passieren rasch die Zellwand und besitzen aufgrund des reversiblen Bindungsmechanismus eine kurze Verweilzeit im aktiven Zentrum. Aldehyde werden intrazellulär schnell zu Carbonsäuren oxidiert, was einen schnellen Transport der Inhibitor-Fragmente aus der Zelle bedingt und mit hohen Dissoziationskonstanten einhergeht.<sup>[52]</sup>



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des kovalent reversiblen Bindungsmechanismus von peptidischen Aldehyden an Thr1 (oben) und die Strukturen von **MG101 (1)**, **MG132 (2)** und **BSc2118 (3)** (unten). Modifizierte Abbildung nach *Kisselev et al.*<sup>[22, 51]</sup>

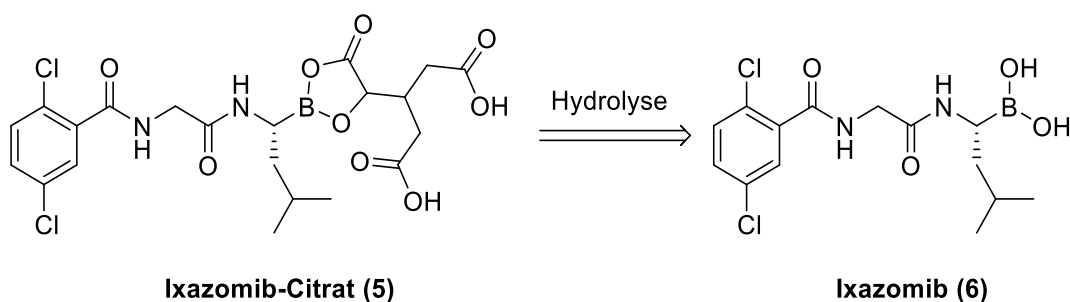
Mit **Bortezomib (Btz, 4)** (Valcade®) wurde 2003 der erste Proteasominhibitor von der amerikanischen Arzneimittelbehörde, der FDA, für die Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen. Bei **Bortezomib (4)** handelt es sich um den prominentesten Vertreter der Inhibitorgruppe der Boronsäuren. Diese elektrophile Kopfgruppe ist deutlich potenter als die Aldehyd-Gruppe und bewirkt eine deutlich geringere Dissoziationskonstante. Der Elektronenmangel am Bor-Atom der Kopfgruppe führt zu einer enormen Affinität zum freien Elektronenpaar des Sauerstoff-Atoms der Hydroxylgruppe von Thr1. Des Weiteren bildet Gly47 das Oxyanion-Loch, das ebenfalls mit einer der Hydroxylgruppen des tetraedrischen Boronat-Addukts verbrückt ist. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung wird zwischen Thr1N und der zweiten Hydroxylgruppe ausgebildet (siehe Abbildung 7). Betrachtet man die zugrunde liegende Chemie der Bindungsknüpfung, so handelt es sich bei der Veresterung einer Borsäure mit einem Alkohol um einen reversiblen Prozess. Die beschriebenen stabilisierenden Wechselwirkungen sorgen allerdings für eine pseudo-irreversible Bindung dieser Klasse von Inhibitoren. Als problematisch bei der klinischen Anwendung von **Bortezomib (4)** hat sich dessen geringe Selektivität gegenüber nicht-Ziel-Proteasen erwiesen, die durch *off-target*-Effekte zu heftigen Nebenwirkungen führt. Etwa 30% der Patienten entwickeln eine periphere Neuropathie, einen

neurotoxischen Effekt, der bis zur kompletten Immobilität der Patienten führen kann. Zwar ist der Prozess reversibel, allerdings limitiert er die Dosis an Wirkstoff, die verabreicht werden kann. Ein möglicher Grund ist die Inhibition der mitochondrialen Serin-Protease HtrA2/Omi, die vor der Degeneration von Nervenzellen schützt.<sup>[22, 53-54]</sup> Weiterhin kommt es bei der Behandlung mit **Bortezomib (4)** häufig zur Ausbildung von Resistenzen, was die Remissionszeit zwischen aufeinanderfolgenden Chemotherapiezyklen verkürzt und eine weitere effektive Behandlung mit dem Wirkstoff verhindert.<sup>[55]</sup>



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des kovalenten Bindungsmechanismus durch Boronsäuren an Thr1 (oben) sowie die Strukturen von **Bortezomib (4)** (frei) und **Bortezomib (4)** (gebunden an Thr1) (unten). Modifizierte Abbildung nach Kisselev *et al.*<sup>[22, 51]</sup>

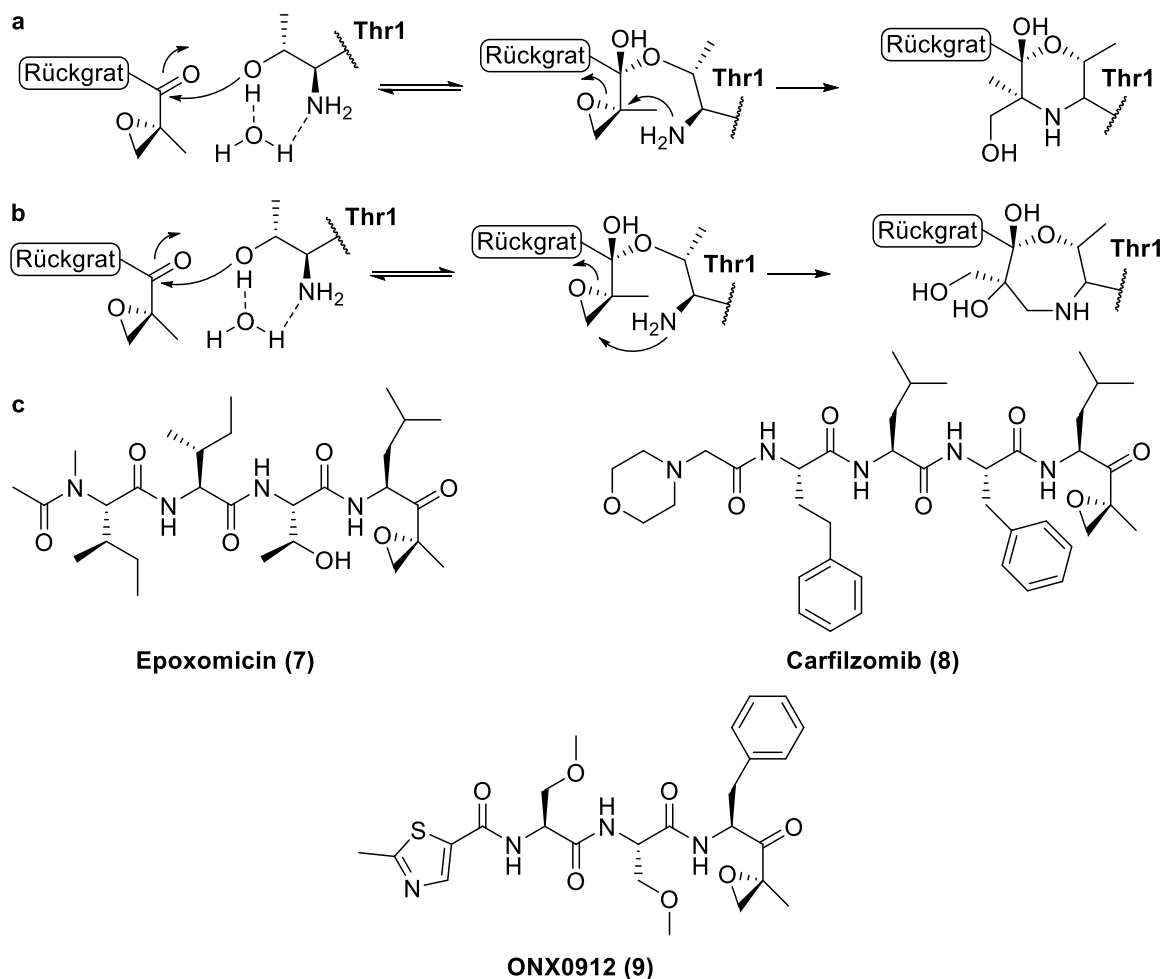
Im Jahre 2015 wurde mit **Ixazomib (6)** (Ninlaro®) der erste oral applizierbare Proteasom-Inhibitor durch die FDA für die Behandlung des Multiplen Myeloms in Kombination mit Chemotherapie zugelassen.<sup>[56-57]</sup> **Ixazomib (6)** trägt ebenfalls eine Boronsäure als elektrophile Gruppe und ist strukturell eng mit **Bortezomib** verwandt. Die Formulierung erfolgt nach dem *Prodrug*-Konzept in Form eines Citrat-Esters der Boronsäure (siehe Abbildung 8), wodurch die orale Verabreichung möglich wird. Der Boronsäureester wird im Blutplasma und Gastrointestinaltrakt hydrolysiert und die aktive Boronsäure wird freigesetzt.<sup>[58-59]</sup> Die Inhibition der  $\beta 5$ -Untereinheit ist durch **Ixazomib (6)** deutlich größer als die der  $\beta 2$ - und der  $\beta 1$ -Untereinheit, wobei dennoch das Auftreten von *off-target*-Effekten beobachtet werden kann.<sup>[60]</sup>



**Abbildung 8:** Darstellung der Struktur von **Ixazomib-Citrat (5)** und dessen Hydrolyseprodukt (6).

Den bekanntesten Vertreter der Gruppe der Epoxyketone stellt **Carfilzomib (Cfz, 8)** (Kyprolis®) dar, das 2012 zur Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen wurde. Im Gegensatz zu **Bortezomib (4)** wird die  $\beta 5$ -Untereinheit des Proteasoms selektiv und irreversibel gebunden.

Hierbei wird die Strategie verfolgt, die Selektivität gegenüber Threonin-Proteasen durch die Einführung bivalenter Kopfgruppen zu erhöhen. Diese Kopfgruppen binden sowohl Thr1Oγ, als auch Thr1N, wobei der Naturstoff **Epoxomicin (7)** den Vorreiter dieser Substanzklasse bildet, von dem sich **Carfilzomib (8)** ableitet (siehe Abbildung 9). Die Analyse der Kristallstruktur des yCPs im Komplex mit **Epoxomicin (7)** lieferte Hinweise auf einen plausiblen Bindungsmechanismus. Thr1Oγ reagiert in einer 1,2-Addition mit der Carbonylgruppe des Inhibitors unter Ausbildung einer Halbketal-Zwischenstufe. Das entstandene tetraedrische Intermediat wird durch das Oxyanion-Loch stabilisiert, was zu einer Aktivierung des Epoxids für einen nukleophilen Angriff durch Thr1N und somit zur Ausbildung eines Morpholin-Rings führt. Während die Bildung des Halbketals noch einen reversiblen Schritt darstellt, so ist der Ringschluss zum Morpholin irreversibel. Dieser Mechanismus führt zu einer außerordentlichen Selektivität, da die katalytischen Reste von Serin- und Cysteinproteasen keine freien α-Amino-gruppen tragen und somit nicht in der Lage sind ein solches Morpholin-Addukt zu bilden.<sup>[61-62]</sup> Neuste Analysen von hochaufgelösten Kristallstrukturen liefern Hinweise, dass statt des Morpholin-Rings, ein siebengliedriger 1,4-Oxazepan-Ring gebildet wird. Dies geschieht durch den Angriff von Thr1N an den β-Kohlenstoff des Epoxids anstelle des α-Kohlenstoff Atoms (siehe Abbildung 9).<sup>[63]</sup>

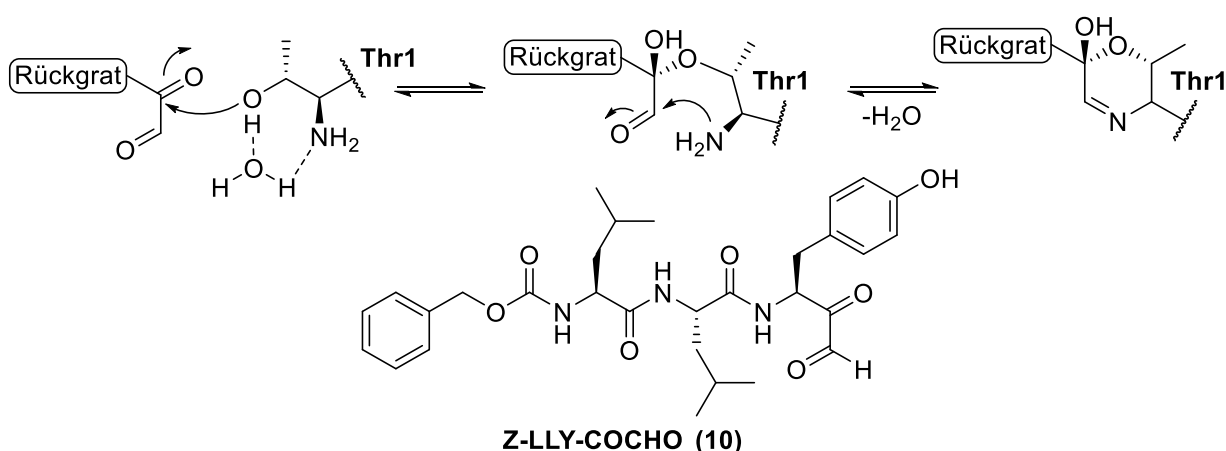


**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des kovalenten und irreversiblen Bindungsmechanismus von Epoxyketonen an Thr1 unter Ausbildung eines Sechsrings (a) bzw. eines Siebenrings (b) und die Strukturen von **Epoxomicin (7)**, **Carfilzomib (8)** und **ONX0912 (9)** (c). Modifizierte Abbildung nach *Stein et al.* und *Schrader et al.*<sup>[4, 61, 63]</sup>

Einen oral-verfügbaren Proteasominhibitor mit Epoxyketon-Kopfgruppe stellt **ONX0912 (9)** dar, der gegenwärtig in klinischen Studien evaluiert wird. Eine Variation der Seitenketten sowie eine Verkürzung des Peptidrückgrates zu einem Tripeptid, führen zu einer deutlich gesteigerten Wasserlöslichkeit im Vergleich zu **Carfilzomib (8)**.<sup>[54]</sup>

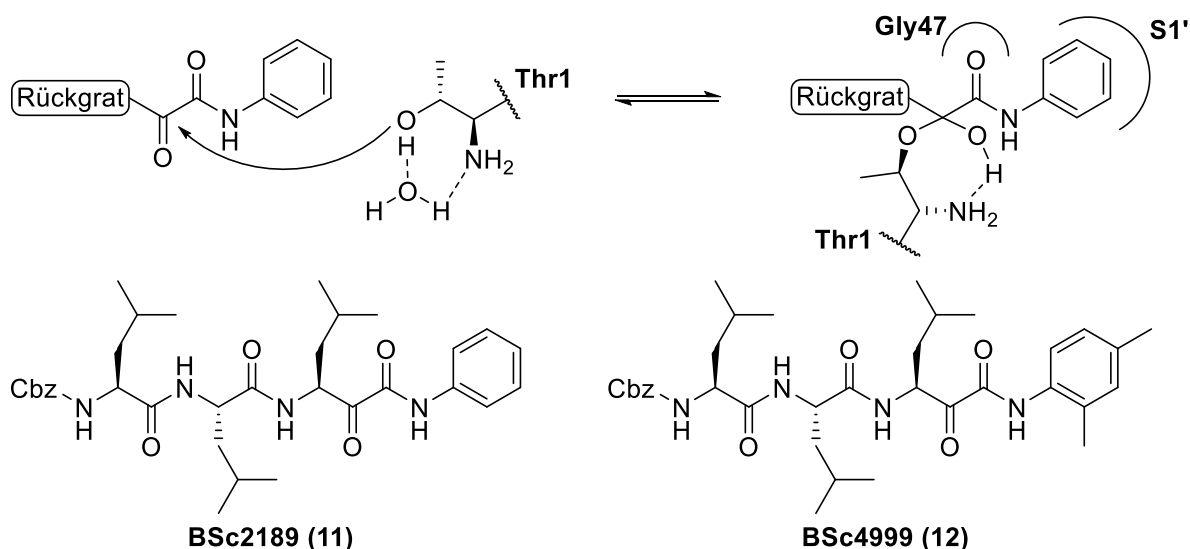
Ein Problem der vorgestellten (pseudo)-irreversibel bindenden Inhibitoren stellt deren geringe Halbwertszeit dar, die durch eine mögliche Inaktivierung durch Glutathion oder durch ubiquitär vorkommende Zielproteine bedingt wird. Des Weiteren ist durch die irreversible Bindung die Anwendung der Inhibitoren auf verschiedene Arten von nicht-solidem Blutkrebs beschränkt. Eine Alternative können kovalent-reversibel bindende Inhibitoren des Proteasoms darstellen, wodurch prinzipiell eine Durchdringung festen Gewebes ermöglicht werden kann.<sup>[61]</sup> Die Verwendung von Boronsäuren und Aldehyden scheidet auf Grund der bereits genannten Probleme in Form von hoher metabolischer Instabilität und mangelnder Selektivität der Aldehyde sowie dem pseudo-irreversiblen Bindeverhalten der Boronsäuren aus.<sup>[22]</sup> Im Folgenden werden weitere kovalent-reversibel bindende elektrophile Kopfgruppen vorgestellt.

Die Gruppe der peptidischen  $\alpha$ -Ketoaldehyde, die 1998 entwickelt wurde, hat sich als hoch potente und kovalent-reversibel bindende Proteasominhibitoren herausgestellt. Der Binde-mechanismus ist, ähnlich der Epoxyketone, bivalent und wurde 2011 durch die Analyse der Kristallstruktur von **Z-LLY-COCHO (10)** im Komplex mit dem yCP aufgeklärt (vergleiche Abbildung 10). Zunächst greift das nukleophile Thr1Oy die Carbonylgruppe des Ketons unter Ausbildung eines Halbketals an, wobei die gebildete Hydroxylgruppe im Oxyanion-Loch stabilisiert wird. Anschließend kommt es zur Ausbildung eines Carbinolamin-Intermediats durch den Angriff von Thr1N an die Carbonylgruppe des Aldehyds. Die folgende Kondensation zur Schiff-Base führt unter Wasserabspaltung zur Ausbildung eines Dihydrooxazin-Rings. Im Gegensatz zur Morpholin-Bildung durch Epoxyketone ist hierbei der letzte Schritt reversibel, da er durch die Addition von Wasser umgekehrt werden kann. Durch den Mechanismus der beschriebenen Bindungsbildung erhalten  $\alpha$ -Ketoaldehyde, sowie Epoxyketone eine außer-ordentliche Selektivität gegenüber anderen Proteasen.<sup>[64]</sup> Aufgrund der beobachteten relativ geringen Inhibitionsstärke sowie schwacher zytotoxischer Eigenschaften gegenüber Krebszelllinien, erwiesen sich  $\alpha$ -Ketoaldehyde bis dato allerdings als ungeeignet für die Tumorthherapie. Vermutlich kommt es hierbei, wie bei den Aldehyden auch, zu einer schnellen metabolischen Inaktivierung.<sup>[61]</sup>



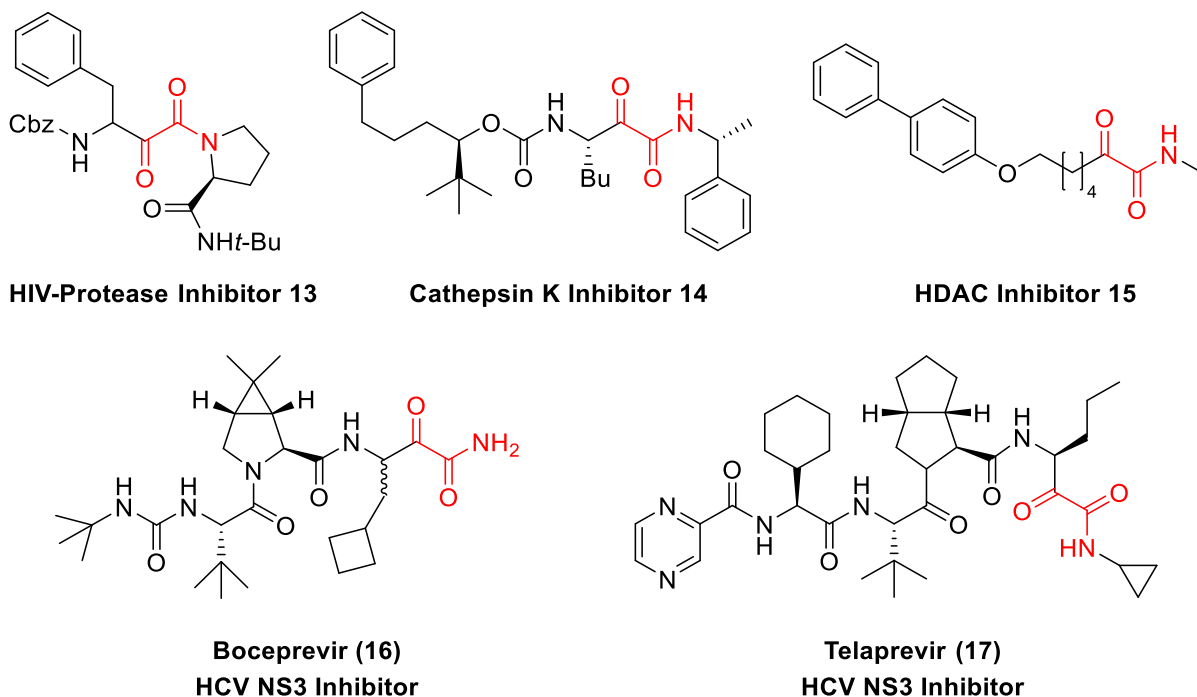
**Abbildung 10:** Schematische Darstellung des kovalent-reversiblen Bindungsmechanismus von  $\alpha$ -Ketoaldehyden an Thr1 (oben) und die Struktur von **Z-LLY-COCHO (10)**. Modifizierte Abbildung nach *Stein et al.*<sup>[4, 61]</sup>

Eine metabolisch stabilere Weiterentwicklung der bereits beschriebenen  $\alpha$ -Ketoaldehyde stellt die Substanzklasse der  $\alpha$ -Ketophenylamide dar. Diese zeigen einen einzigartigen Bindungsmodus, gehen jedoch keinen bivalenten Bindemechanismus ein und wurden erstmals 1999 von Chatterjee vorgestellt.<sup>[65]</sup> Mit **BSc2189 (11)** wurde 2005 von Braun *et al.* ein selektiver Inhibitor der  $\beta 5$ -Untereinheit vorgestellt (Abbildung 11).<sup>[51]</sup> Das Besondere dieser Substanzklasse ist, im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Inhibitorklassen, dass eine Adressierung der gestrichenen Seite des Substratbindekanals des Proteasoms möglich wird. Dies bietet die Möglichkeit neue Selektivitäten zu generieren, die die geringere Elektrophilie der Kopfgruppe ausgleichen können und neue pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften ermöglichen. Der nukleophile Angriff von Thr1Oy erfolgt ausschließlich an der  $\alpha$ -Ketogruppe unter Ausbildung eines Halbketals. Hierbei wird die entstehende Hydroxylgruppe, im Gegensatz zu den bereits vorgestellten Inhibitoren, durch eine Wechselwirkung mit Thr1N stabilisiert und entgegen des Oxianionen-Lochs platziert. Dieses bildet stattdessen Wechselwirkungen in Form von H-Brücken, ausgehend von Gly47, mit der Carbonylgruppe der Amidbindung aus, was eine Projektion der Phenylgruppe in die gestrichene Seite des Substratbindekanals bewirkt (Abbildung 11). Ein systematischer Vergleich verschiedener elektrophiler Kopfgruppen auf ihre Aktivität, Zellgängigkeit, Selektivität sowie ihr reversibles Bindeverhalten identifizierte 2014 die Substanzklasse der  $\alpha$ -Ketoamide als besonders vielversprechendes Motiv für das zukünftige Design von Proteasominhibitoren. Hierfür wurden sechs verschiedene elektrophile Kopfgruppen mit gleichbleibendem Peptidrückgrat verglichen. Obwohl das entsprechende  $\alpha,\beta$ -Epoxyketon und die Boronsäure geringere  $IC_{50}$ -Werte aufwiesen als **BSc2189 (11)**, wird durch ihr (pseudo)-irreversibles Bindeverhalten der Einsatz auf Tumore des blutbildenden Systems beschränkt. **BSc2189 (11)** hingegen besitzt potenziell die Möglichkeit, aufgrund seines reversiblen Bindungsmodus, auch gegen solide Tumore zu wirken. Ausgehend von **BSc2189 (11)** wurde 2014, in der Arbeitsgruppe B. Schmidt, **BSc4999 (12)** entwickelt, das einen nochmals deutlich potenteren Vertreter der kovalent-reversibel bindenden  $\alpha$ -Ketoamide und den Startpunkt für weitere Optimierungen darstellt.<sup>[51, 61, 66]</sup> Neuere Untersuchungen zur Belegung der gestrichenen Seite des Substratbindekanals haben gezeigt, dass dies auch durch größere Substituenten, wie einem 1-Naphthylrest möglich ist, der über ein  $\alpha$ -Ketoamid mit einem Peptidrest verknüpft ist.<sup>[60]</sup>



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung des kovalent-reversiblen Bindungsmechanismus von  $\alpha$ -Ketoamiden an Thr1 (oben) und die Strukturen von **BSc2189 (11)** und **BSc4999 (12)** (unten). Modifizierte Abbildung nach Voss *et al.*<sup>[66]</sup>

Neben der Verwendung als Proteasominhibitoren findet das  $\alpha$ -Ketoamid-Strukturmotiv Anwendung bei einer Vielzahl weiterer Inhibitoren. Darunter befinden sich Hemmstoffe für Thrombin, die HIV-Protease, die Norovirus 3CL-Protease, Cathepsin K, die Histondeacetylase (HDAC), die PPIase, die PLA<sub>2</sub> und viele Weitere (siehe Abbildung 12). Mit **Boceprevir (16)** und **Telaprevir (17)** wurden 2011 von der FDA zwei  $\alpha$ -Ketoamid-basierte Inhibitoren für die Behandlung von chronischer Hepatitis zugelassen, die die HCV-NS3-Serinprotease hemmen.<sup>[67]</sup>



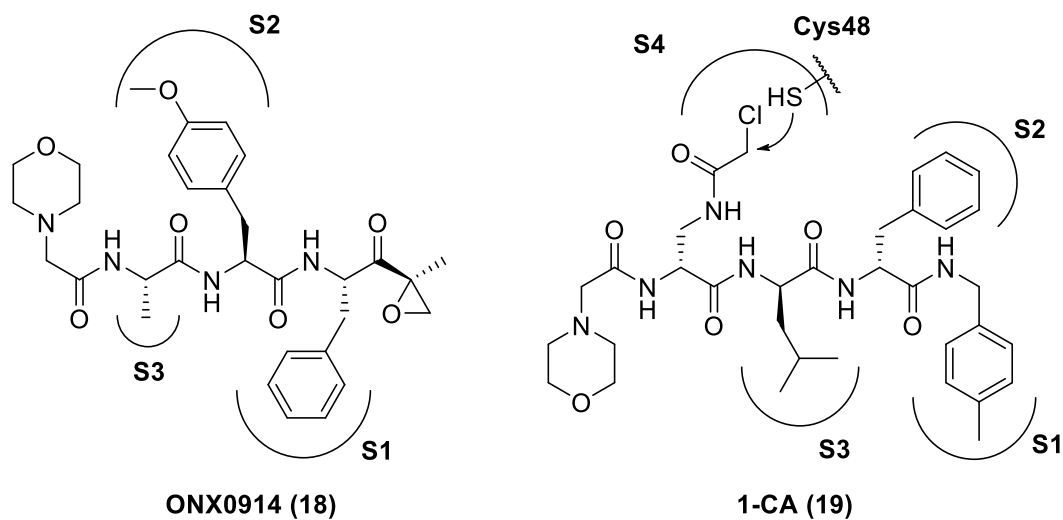
**Abbildung 12:** Ausgewählte Strukturen von Wirkstoffen mit einem  $\alpha$ -Ketoamidmotiv und deren Verwendung.<sup>[67]</sup>

### 1.1.6. Selektive Inhibitoren für das Immunoproteasom

Die bereits in Abschnitt 1.1.5. besprochenen Proteasominhibitoren wurden hauptsächlich für die Inhibition des konstitutiven Proteasoms entwickelt und zeigen keine besondere Selektivität zwischen dem cCP und dem iCP. Das Tetrapeptid **ONX0914 (18)** stellt den ersten selektiven Immunoproteasom-Inhibitor dar, der sich gegenwärtig in der klinischen Testung befindet und ebenfalls auf einem Epoxyketon basiert, das Thr1Oy irreversibel bindet (Abbildung 13). Durch die spezielle Wahl der Aminosäureseitenketten wird eine Selektivität für das iCP erreicht, indem eine sterisch anspruchsvolle Phenylalanin-Seitenkette die beim iCP vergrößerte S1-Tasche besetzt und ein kleiner Alanin-Rest für P3 gewählt wurde. **ONX0914 (18)** führt zu einer Senkung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wodurch die T-Zell Differenzierung beeinträchtigt wird, was im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen steht. Weiterhin unterbindet **ONX0914 (18)** die Ausbildung der MHC-I-Peptid-Komplexe, die auf der Zelloberfläche präsentiert werden und eine Immunantwort auslösen, um 50%.<sup>[26, 33]</sup>

Ein weiterer Ansatz für eine selektive Inhibition des Immunoproteasoms stellt der gezielte Angriff an das nicht katalytische Cys48 in der S4-Tasche des Substratbindekanals der  $\beta$ 5i-Untereinheit dar, das nur im iCP vorzufinden ist. Durch *Dubiella et al.* wurden eine Reihe von peptidischen Verbindungen entwickelt, die eine kovalente irreversible Bindung mit Cys48 ausbilden und damit bis zu 150-fach gesteigerte Selektivitätswerte erreichen. Die vielver-

sprechendste Verbindung **1-CA (19)** trägt eine elektrophile Chloracetamid-Gruppe, die durch die Thiolgruppe von Cys48 nukleophil angegriffen wird und eine irreversible Bindung ausbildet. (siehe Abbildung 13).<sup>[25]</sup>



**Abbildung 13:** Strukturen der für das Immunoproteasom selektiven Inhibitoren **ONX0914 (18)** und **1-CA (19)** mit der entsprechenden Belegung der Substratbindetaschen.<sup>[4, 25]</sup>



---

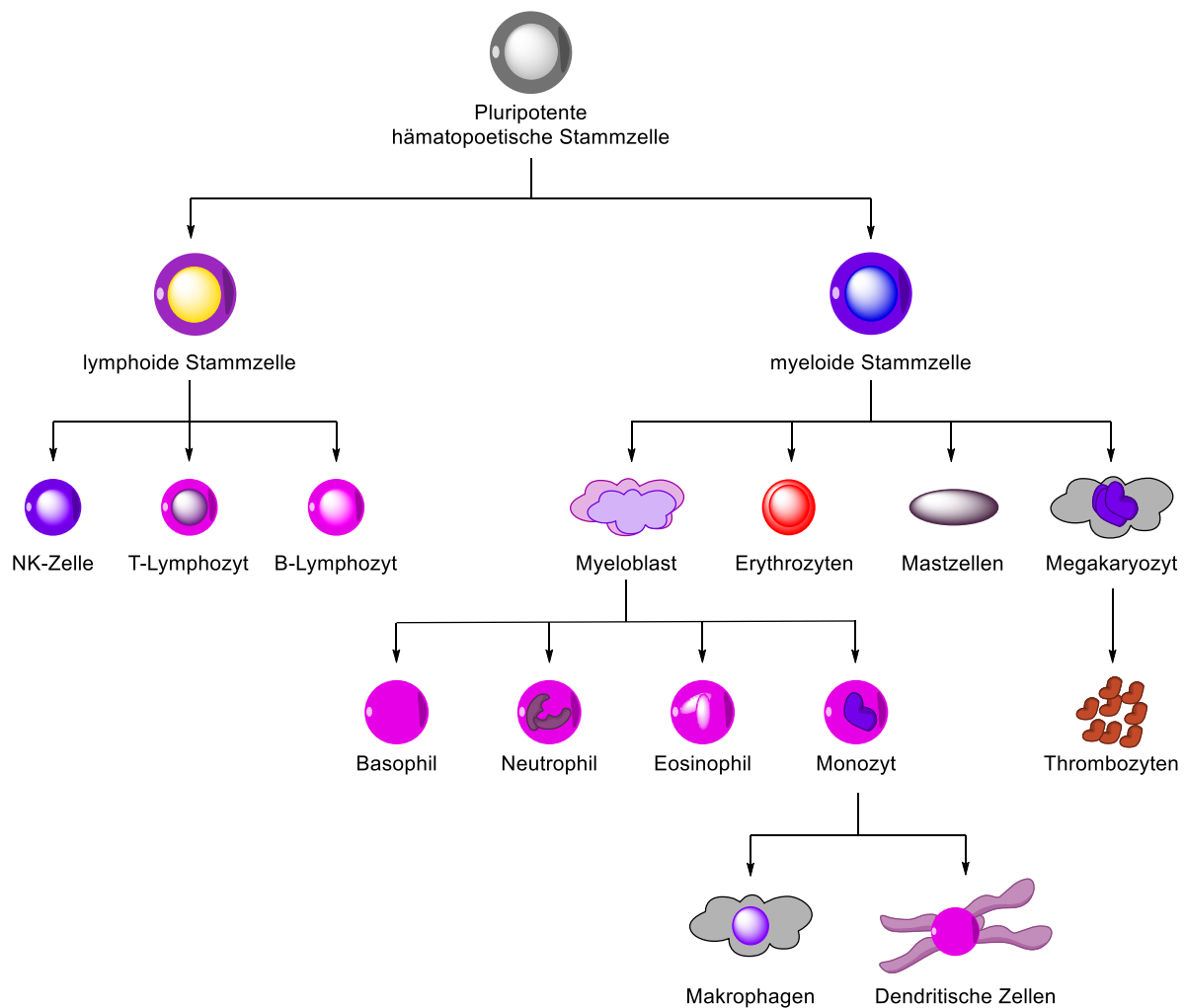
## 1.2. Charakterisierung und Unterteilung von Leukämien

Wie bereits erwähnt, zählen Krebserkrankungen zu den häufigsten Todesursachen der Industrieländer. Weltweit erkranken ca. 350.000 Menschen pro Jahr an Leukämie und bei 250.000 führt die Erkrankung zum Tode. In Deutschland wurde im Jahre 2014 bei 13.700 Patienten eine Leukämie diagnostiziert. Bei Kindern unter 15 Jahren liegt das Risiko zur Entwicklung einer Leukämie bei hohen 4%, sinkt aber bei Kindern und Jugendlichen mit zunehmendem Alter. Ab dem 30. Lebensjahr erhöht sich die Wahrscheinlichkeit wieder kontinuierlich, wobei die Inzidenz bei Männern mit 1,6% höher als bei Frauen mit 1,2% ist. Zwischen 1999 und 2014 ist eine gleichbleibende Erkrankungsrate zu beobachten, wohingegen die Sterberate rückläufig ist. Bei etwa 40% der neu diagnostizierten Leukämien handelt es sich um chronisch lymphatische Leukämien gefolgt von akuten myeloischen Leukämien mit 21%.<sup>[2, 68]</sup> Generell können keine allgemeingültigen Risikofaktoren benannt werden, jedoch wird das Risiko an Leukämie zu erkranken durch ionisierende Strahlung und Zytostatika erhöht. Des Weiteren stehen verschiedene Chemikalien, beispielsweise Benzol, sowie genetische Veränderungen, insbesondere Trisomie 21, im Verdacht die Entwicklung einer Leukämie zu begünstigen.<sup>[69-72]</sup>

Die Beschreibung der Leukämie als abnormale Vermehrung weißer ALL Blutzellen erfolgte im 19. Jahrhundert unabhängig voneinander durch *John Bennett*, *Alfred Donné* und *Rudolf Virchow*, nachdem die Symptome erstmals bei Patienten beobachtet wurden.<sup>[73]</sup> Medizinisch betrachtet, handelt es sich bei Leukämie um eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems. Bei gesunden Menschen werden im Rahmen der Hämatopoese, ausgehend von pluripotenten Stammzellen, über Vorläuferzellen, die funktionalen Blutzellen im Knochenmark gebildet. Über die myeloiden Vorläuferzellen differenzieren die pluripotenten Stammzellen schließlich in Makrophagen, Erythrozyten, Thrombozyten und dendritische Zellen sowie basophile-, eosinophile- und neutrophile Granulozyten. Des Weiteren können sich die multipotenten Stammzellen über lymphatische Vorläuferzellen zu NK-Zellen, B-Lymphozyten und T-Zellen entwickeln (siehe Abbildung 14).<sup>[74]</sup>

Die leukämischen Erkrankungen äußern sich durch die fehlende Differenzierung in die ausgereiften funktionalen Blutzellen. Man unterscheidet dabei, ob die myeloische oder die lymphatische Entwicklungslinie betroffen ist und in welchem Stadium der Differenzierung sie auftreten. Bei den akuten Formen ist die Blastenphase betroffen, wodurch es zu einer schnellen Reproduktion unreifer Blasten im Knochenmark kommt, die die gesunden Zellen verdrängen. Dies führt zum Auftreten der entsprechenden Krankheitssymptome, in Form einer gesteigerten Infektionsanfälligkeit sowie einer Reduktion der Erythrozyten, wodurch es zu einer Anämie kommt. Ab einer gewissen Anzahl kommt es auch zu einem Auftreten der unreifen Blasten im Blut, wodurch weitere Organe des blutbildenden Systems wie Milz und Leber befallen werden können. Dies führt zu erkennbaren Vergrößerungen der Organe, die einen Teil des klinischen Phänotyps bilden. Die chronischen Leukämien treten in einer späteren Phase der Differenzierung der Blutzellen auf. Somit weisen die betroffenen Zellen eine höhere Funktionsfähigkeit auf, reifen jedoch ebenfalls nicht zu ausgereiften Blutzellen heran. Die unausgereiften Zellen akkumulieren langsam im Knochenmark und verdrängen somit nach und nach die physiologische Hämatopoese. Somit kommt es zu einem deutlich langsameren Krankheitsverlauf, der lange symptomlos ist und meist erst bei Routineuntersuchungen entdeckt wird. Je nach Stadium der Zelldifferenzierung und der betroffenen Zelllinie ergeben sich somit vier übergeordnete Formen der Leukämie. Die chronische lymphatische Leukämie (CLL, 30%), die chronische myeloische Leukämie (CML, 13%), die akute lymphatische Leukämie (ALL, 13%)

und die akute myeloische Leukämie (AML, 28%). Die restlichen 17% entfallen auf weitere Unterformen der Leukämie.



**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu funktionalen myeloischen und lymphatischen Blutzellen. Modifizierte Abbildung nach *Laurenti et al.*<sup>[75]</sup>

### 1.2.1. Klinische Symptome und Ursachen der AML

Bei der akuten myeloischen Leukämie kommt es zu einer invasiven Ausbreitung von myeloischen Blasten in das Knochenmark. Hierdurch ist der Reifungsprozess der sich erneuernden Blutzellen gestört und durch die Entartung unreifer myeloischer Stammzellen können keine funktionsfähigen Blutzellen gebildet werden. Häufen sich die leukämischen Blasten an und führen zur Ausbildung eines soliden Tumors, wird dieser als myeloides Sarkom bezeichnet. Am häufigsten kommt es zu einer Entartung einer Vorläuferzelle der weißen Blutzellen, den Myeloblasten. Grundsätzlich kann eine Entartung aber bei allen Vorläufern myeloischer Zellen stattfinden. Tritt eine Entartung der Myeloblasten ein, so kommt es zu einer unkontrollierten und raschen Vermehrung von unausgereiften Leukozyten. Durch diesen Prozess kommt es zu einer Störung der normalen Hämatopoese, wodurch ausgereifte Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten nicht mehr in der benötigten Menge gebildet werden können. Die sich daraus ergebenden klinischen Symptome sind Infektionen, Fieber, Anämie sowie Blutungen, wobei es sich häufig um erste Anzeichen der Erkrankung handelt. Die akute

---

myeloische Leukämie tritt in verschiedenen Formen auf, die durch die betroffenen entarteten Vorläuferzellen sowie deren unterschiedliche Reifungsgrade definiert wird. Die AML zeigt einen äußerst aggressiven Krankheitsverlauf und führt unbehandelt in wenigen Wochen zum Tod. Die Überlebensrate hängt von der Form der ausgeprägten AML ab und ist bei jüngeren Patienten weitaus höher als bei älteren Patienten.<sup>[76-78]</sup>

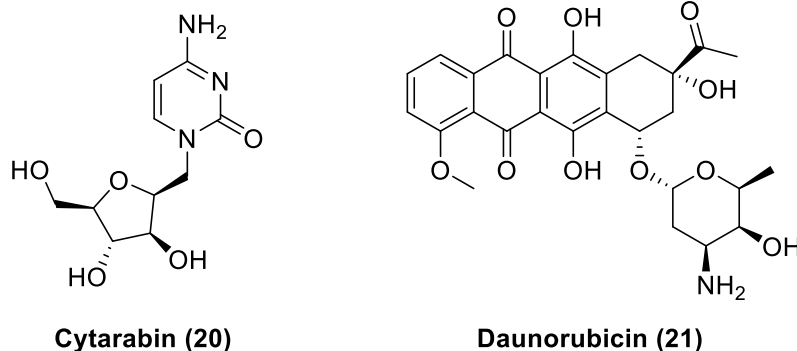
Damit für eine Entstehung der AML eine Zelle entartet und unkontrolliert proliferiert müssen mindestens zwei verschiedene Arten von Mutationen auftreten. Zum einen muss durch eine Mutation die Proliferation gefördert werden bzw. anti-apoptotische Eigenschaften verliehen werden (Typ-I-Mutation). Zum anderen sorgt eine Typ-II-Mutation dafür, dass die Fähigkeit der Zelldifferenzierung verlorengeht. Ein ständiges proliferatives Verhalten kommt oft durch eine Mutation zustande, die zur Aktivierung von Signalwegen führt, die durch Kinasen beeinflusst werden. Hierbei sind für eine Ausbildung der AML beispielsweise die Kinasen FLT3, c-KIT und JAK2 zu nennen, die durch eine Mutation konstitutiv aktiviert werden können. Des Weiteren können aber auch Mutationen in RAS, einem Liganden des FLT3- und des c-KIT-Rezeptors, die Kinasen in eine dauerhaft aktive Form versetzen. Durch Typ-II-Mutationen wird die Differenzierung der myeloischen Vorläuferzellen durch Interferenzen mit Transkriptionsfaktoren oder Co-Aktivatoren blockiert, wobei die Fähigkeit der Selbsterneuerung aber vorhanden bleibt. Häufig betroffene Gene sind AML1 oder CEBPA.<sup>[79-81]</sup>

Die häufigsten pathogenen Mutationen, die im Zusammenhang mit AML stehen, betreffen die *Fms*-ähnliche Tyrosinkinase 3 (FLT3), deren Rolle in Abschnitt 1.2.3. näher beschrieben wird.<sup>[82]</sup>

### 1.2.2. Therapieansätze der AML

Die Behandlungsart der AML ist abhängig von der Form der Erkrankung, der zytogenetischen Einstufung und dem Alter der Patienten. Die Therapieformen reichen hierbei von einer rein palliativen Behandlung bis zu experimentellen Therapien in klinischen Studien. Prinzipiell unterteilt sich die Therapie in eine Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungsphase, wobei die Behandlung durch eine Chemotherapie von zentraler Bedeutung ist. Die kurze und intensive Induktionstherapie verfolgt das Ziel, die Zahl der Blasten auf eine normale Zahl zu reduzieren, während die Konsolidierungstherapie dafür sorgen soll, dass auch die minimale Resterkrankung unterdrückt wird. Die Erhaltungstherapie erstreckt sich anschließend über Monate bis Jahre und soll die Krankheit in Remission halten.

Bei der Standardtherapie wird eine Kombination von Zytostatika verwendet, die oral, subkutan oder intravenös appliziert werden (Abbildung 15). Die standardmäßig verwendeten Zytostatika sind zum einen **Cytarabin (20)**, wobei es sich um ein Pyrimidin-Analogon handelt, dass als kompetitiver Hemmstoff des Nukleinsäurestoffwechsels wirkt. Zum anderen wird ein Anthrazyklin, meist **Daunorubicin (21)**, verabreicht, das die Topoisomerase II hemmt, für die Bildung freier Radikale sorgt und in die DNA interkaliert. In seltenen Fällen, bei einer Infiltration des Zentralnervensystems durch leukämische Blasten, wird die Behandlung durch eine therapeutische Bestrahlung des Kopfes ergänzt. Bei AML-Rückfallpatienten kann nach einer Hochdosis-Chemotherapie eine allogene oder autologe hämatopoetische Stammzellentransplantation erfolgen, insofern ein passender Spender gefunden wird.<sup>[83-86]</sup>



**Abbildung 15:** Strukturen der für die Induktionstherapie der AML verwendeten Zytostatika **Cytarabin (20)** und **Daunorubicin (21)**.

AML-Patienten, deren Tumorzellen das Oberflächenprotein CD33 exprimieren, können in Kombination mit Standard-Chemotherapie mit dem *antibody-drug-conjugate* **Gemtuzumab-Ozogamicin** (Mylotarg®) behandelt werden. Bindet Mylotarg an das CD33-Antigen auf der Oberfläche von Myeloblasten, wird es in die Zelle aufgenommen und Ozogamicin, ein Derivat der hochgradig zelltoxischen Substanz **Calicheamicin**, wird freigesetzt, wodurch die Apoptose ausgelöst wird.<sup>[87]</sup>

Des Weiteren werden klinische Studien durchgeführt, die die Kombination von Proteasom-inhibitoren, insbesondere **Bortezomib (4)**, mit der bereits beschriebenen Therapie mit **Cytarabin (20)** und Anthrazyklinen untersuchen. Die Wirkweise der Proteasominhibitoren gleicht hierbei der bereits beschriebenen aus Abschnitt 1.1.4. Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine positive Beeinflussung der Remissionsrate, was für einen positiven Effekt von Proteasominhibitoren bei der Behandlung der AML spricht. Außerdem hat sich gezeigt, dass **Bortezomib (4)** in der Lage ist, den Abbau einer mutierten Form der FLT3-Kinase (FLT3-ITD), die im Zusammenhang mit AML steht, durch Autophagie auszulösen, was zu einer verbesserten Überlebensrate führt.<sup>[88-90]</sup>

Besondere Aufmerksamkeit erregt gegenwärtig die Klasse der FLT3-Inhibitoren als Wirkstoffe für die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie.<sup>[82]</sup> Der Aufbau der FLT3-Kinase, deren Funktion und der Zusammenhang mit AML werden im Folgenden näher erläutert.

### 1.2.3. Die FMS-*like* Tyrosinkinase 3 – FLT3

Bei FLT3 handelt es sich um eine Rezeptortyrosinkinase, welche als membranständige Proteine extrazelluläre Signale in den intrazellulären Raum weiterleiten. Aufgebaut sind sie typischerweise aus einer extrazellulären Rezeptordomäne, einer Transmembranhelix, einer Juxtamembrandomäne und der eigentlichen Kinasedomäne. Bei den Tyrosinkinasen erfolgt die Übertragung einer Phosphatgruppe von einem an das Enzym gebundenen ATP-Molekül auf ein Substratmolekül, genauer auf die Hydroxylgruppe eines Tyrosins. Durch die Phosphatübertragung wird die biologische Aktivität des Substrats beeinflusst, wodurch Tyrosinkinasen an der Regulation von Prozessen wie Zellwachstum, Stoffwechsel, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt sind. Eine selektive Inhibition bestimmter Tyrosinkinasen stellt somit eine vielversprechende Strategie für die Entwicklung neuer Medikamente für die Behandlung von beispielsweise malignen Neoplasien dar.<sup>[91-92]</sup>



---

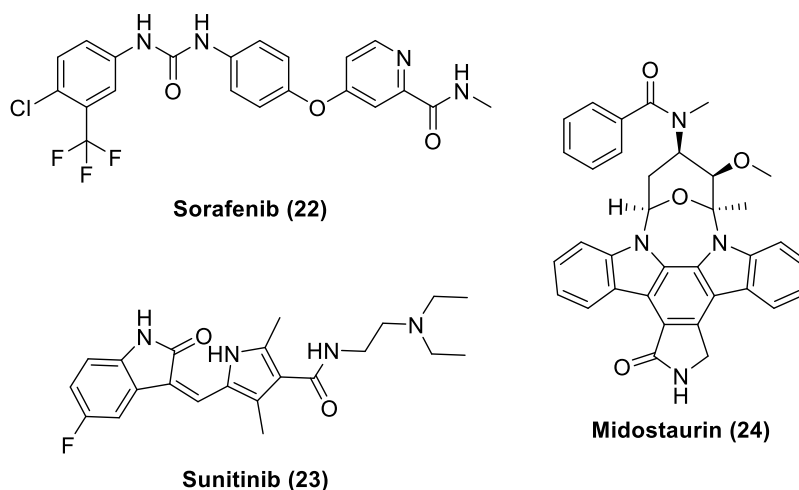
Die Stabilisierung der inaktiven Form der Kinase wird durch die Phosphorylierung der Tyrosinseitenketten in der JM-Domäne aufgehoben. Die Aktivierung von FLT3 wird durch die Bindung des FLT3-Liganden (FL) an FLT3 ausgelöst, wodurch es zu einer induzierten Aktivitätssteigerung durch Dimerisierung kommt. Im Folgenden findet eine Autophosphorylierung von Tyrosinseitenketten durch ein gebundenes ATP-Molekül statt, im Falle von FLT3 wird Tyr589 und/oder Tyr591 der Juxtamembrandomäne *trans*-phosphoryliert. Dadurch bewegt sich die JM aus der regulatorischen Tasche und die Aktivierungsschleife ändert ihre Position so, dass das DFG-Motiv in die regulatorische Tasche ragt (DFG-out zu DFG-in). Dies ermöglicht Substraten den Zugang zur Kinase, welche über die Beeinflussung bestimmter Signalwege essenzielle Mechanismen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose steuern.<sup>[91, 93-96]</sup>

#### 1.2.4. Inhibition der FLT3 Kinase zur Therapie der AML

Exprimiert wird die FLT3-Kinase in unreifen hämatopoetischen Zellen sowie neuronalen Zellen und ist weiterhin in der Plazenta, den Drüsen und dem Gehirn vorzufinden. Die Expression erfolgt hierbei vor allem in CD34-positiven Vorläuferzellen sowie einigen CD34-negativen Vorläuferzellen, die zu dendritischen Zellen differenzieren. Eine hohe Expressionsrate von FLT3 sowie mutierten Varianten ist in hämatopoetischen Malignomen zu finden, beispielsweise im Falle der akuten myeloischen Leukämie, der akuten lymphoblastischen Leukämie oder auch der chronischen myeloischen Leukämie. Hierbei ist das übermäßige Auftreten nicht mehr nur mit CD34-positiven Zellen assoziiert. Eine besonders schlechte Prognose in Form von geringen Remissions- und Überlebensraten für AML-Patienten, wird mit dem Auftreten zweier verschiedener Mutationen des FLT3-Gens beobachtet. Bei ca. 24% der AML-Patienten tritt eine aktivierende FLT3-ITD Mutation (ITD, *internal tandem duplication*) im für die Juxtamembrandomäne codierenden Bereich auf. Hierbei ist ein Genabschnitt von 3 – 400 Basenpaaren doppelt im FLT3-Gen enthalten, was zu einem funktionalen Protein mit verlängerter Juxtamembrandomäne führt. Die ITD-Mutation führt somit zu einer Destabilisierung der inaktiven Form der Kinase und bewirkt eine konstitutive Aktivierung, durch Liganden-unabhängige Dimerisierung des Proteins. Neben der beschriebenen ITD-Mutation treten weiterhin Punktmutationen des FLT3-Gens bei ca. 7% der AML-Patienten auf (FLT3-TKD), die zu einer Substitution von einer einzelnen Aminosäure in der exprimierten Kinase innerhalb der Aktivierungsschleife führen. Diese Substitution bedingt eine geänderte Konformation der Kinase, wodurch die autoinhibitorische Funktion gestört wird und es zu einer Aktivierung kommt. Am häufigsten sind Punktmutationen von D835, genauer D835Y aber auch D835V, D835H, D835E und D835N zu finden. Die Mutations-bedingte gesteigerte Aktivität der FLT3-Kinase induziert eine gesteigerte Aktivität der *downstream* Signalwege (beispielsweise PI3K, Ras, STAT5 und ERK1/2), wodurch sich Auswirkungen auf die Regulation der Signaltransduktion, Genexpression und Wachstums- bzw. Differenzierungsprozesse ergeben.<sup>[97-100]</sup>

Für die Therapie der AML ist die FLT3-Kinase aufgrund ihrer gesteigerten Expression in leukämischen Zellen, sowie die durch Mutationen bedingte konstitutive Aktivierung ein vielversprechendes Ziel. Eine Therapie mit FLT3-Inhibitoren soll die Proliferation von leukämischen Zellen eindämmen und Apoptose einleiten. Die Inhibition der FLT3-Kinase erfolgt hierbei kompetitiv mit ATP an dessen Bindungsstelle. Potenzielle Inhibitoren werden auf ihre Verwendung als Monopräparat sowie auf ihre Wirkung in Kombination mit Chemotherapie untersucht.

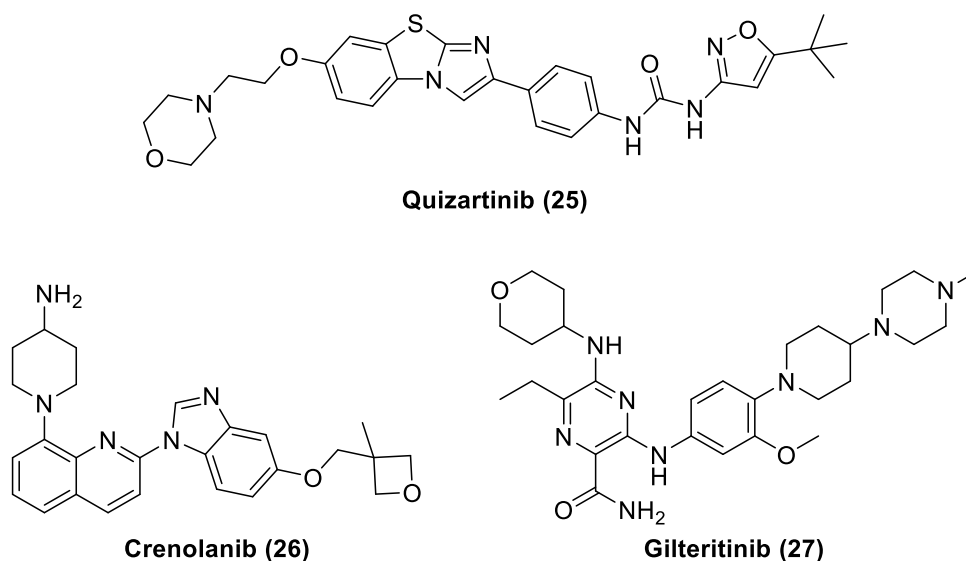
Eine Reihe von Inhibitoren für FLT3 sind bereits identifiziert worden, wobei die erste Generation, darunter **Sorafenib (22)**, **Sunitinib (23)** und **Midostaurin (24)**, jedoch nicht spezifisch für FLT3 entwickelt wurde (siehe Abbildung 17). Die unspezifische Inhibition dieser Multikinase-Inhibitoren ist oft mit einer *off-target*-Toxizität verbunden, wobei sie trotzdem eine gute FLT3-Inhibition zeigen. Bei **Sorafenib (22)** handelt es sich um einen Multikinase-Inhibitor, der neben verschiedenen Tyrosinkinasen wie KIT, PDGFR, VEGFR2, RET eben auch FLT3 inhibiert. Allerdings konnte die Behandlung mit **Sorafenib (22)** bislang nicht zu einer Steigerung des Gesamtüberlebens führen. Bei **Sunitinib (23)** handelt es sich um ein Indolinon-Derivat, das zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms zugelassen ist. Neben FLT3, FLT3-ITD und FLT3-TKD inhibiert es außerdem in einer stärkeren Form KIT, VEGFR2 und PDGFR. Im Jahre 2017 wurde mit **Midostaurin (24)**, einem Derivat des Naturstoffs **Staurosporin** der erste Wirkstoff, der auf die Inhibition der FLT3 Kinase abzielt, in Kombination mit Chemotherapie, zur Behandlung neu diagnostizierter AML mit FLT3-Mutationen zugelassen. **Midostaurin (24)** wurde ursprünglich für die Inhibition von VEGFR2 entwickelt, inhibiert aber ebenfalls FLT3 sowie die ITD- und die TKD-Mutanten. Bei AML-Rückfallpatienten kann eine signifikante Reduktion von peripheren Blasten sowie von Blasten im Knochenmark beobachtet werden.<sup>[101-108]</sup>



**Abbildung 17:** Darstellung der Strukturen der Multikinase-Inhibitoren **Sorafenib (22)**, **Sunitinib (23)** und des Staurosporin Derivats **Midostaurin (24)**.

Die mangelnde Selektivität für FLT3 der vorgestellten Multikinase-Inhibitoren, das Auftreten von Dosis-limitierenden Nebenwirkungen und die geringe Plasmakonzentration der Substanzen, führten zur Entwicklung spezifischer FLT3-Inhibitoren der zweiten Generation, darunter insbesondere **Quizartinib (25)**, **Crenolanib (26)** und **Gilteritinib (27)** (vergleiche Abbildung 18). Bei **Quizartinib (25)** handelt es sich um einen potenten und hochselektiven FLT3-Inhibitor, der ebenfalls die FLT3-ITD-Mutation inhibiert. Eine Kokristallstruktur mit FLT3 hat gezeigt, dass es sich um einen Typ-II-Inhibitor handelt, woraus sich eine nur eingeschränkte Wirkung bei vorliegenden Mutationen der Kinasedomäne ergibt. Des Weiteren ist eine Resistenzbildung zu beobachten, die vermutlich auf D835 Mutationen in der Aktivierungsschleife und Mutationen der *gatekeeper*-Aminosäure F691 zurückzuführen ist. **Crenolanib (26)** stellt einen selektiven FLT3-Inhibitor dar, der ebenfalls bei ITD- sowie TKD-Mutanten inhibitorische Wirkung zeigt. Erste klinische Studien lieferten vielversprechende Ergebnisse mit hohen Remissionsraten. Bei **Gilteritinib (27)** handelt es sich um einen dualen FLT3-AXL-Inhibitor, der zurzeit als Monotherapie sowie in Kombination mit anderen Wirkstoffen in verschiedenen klinischen Studien erprobt wird. Hierbei kann eine signifikante Reduktion der

Blasten von FLT3-ITD-positiven Leukämiezellen beobachtet werden. Im November 2018 erfolgte in den USA die Zulassung für die Behandlung FLT3-mutierter, rezidivierter oder refraktärer AML, in Kombination mit **Cytarabin (20)** und Anthrazyklinen.<sup>[109-113]</sup>



**Abbildung 18:** Strukturen der FLT3-Inhibitoren **Quizartinib (25)**, **Crenolanib (26)** und **Gilteritinib (27)**.

Trotz der vielfältigen Anstrengungen zur Entwicklung hochselektiver FLT3-Inhibitoren, lässt die Resistenzbildung durch Mutationen, nach ersten Therapieerfolgen, bei der Behandlung der AML die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Inhibitoren erkennen. Eine besonders interessante Möglichkeit bietet hierbei die Entwicklung kovalenter Inhibitoren mit einem irreversiblen Bindungsmodus.

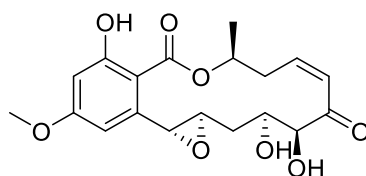
### 1.2.5. Die Verwendung kovalent-bindender Kinase-Inhibitoren

Die Verwendung kovalent-irreversibel bindender Kinase-Inhibitoren bietet gegenüber den klassischen, reversibel bindenden Inhibitoren einige Vorteile. Die Ausbildung der kovalenten Bindung führt zu einer höheren therapeutischen Breite und ermöglicht geringere Wirkstoffkonzentrationen. Dies bedingt allerdings, dass eine selektive, kovalente Inhibition möglich ist und keine Enzym-intrinsische Toxizität vorhanden ist. Besondere Risiken stellen eine idiosynkratische Toxizität sowie anhaltende *off-target*-Effekte dar. Die chemische Bindung wird hierbei zwischen einer nukleophilen Aminosäure-Seitenkette des Zielmoleküls und einer chemisch reaktiven, elektrophilen Gruppe (CRG) des Liganden gebildet. Bei den CRGs handelt es sich beispielsweise um Vinylsulfonamide, Propargylamide, Chinone, Acrylamide oder  $\alpha$ -Haloacetamide. Die Bindungsbildung erfolgt nach der Ausbildung eines starken, reversiblen Komplexes zwischen Ligand und Enzym, der das Elektrophil in der Nähe der nukleophilen Aminosäure positioniert. Die irreversible Bindung findet anschließend entweder durch eine  $S_N2$ -Reaktion oder durch eine Michael-Addition statt. Bei der Ausbildung einer irreversiblen Bindung liegt eine nicht-Gleichgewichtskinetik vor, da das Elektrophil nicht wieder freigesetzt werden kann. Eine Wiederherstellung der Enzymfunktion kann somit nur durch dessen Neusynthese erreicht werden. Dies führt zu einer veränderten Residenzzeit im Zielenzym, was die Inhibitionsstärke deutlich steigert. Eine Verringerung der Wirksamkeit kann *in vivo* durch



unspezifische Bindungsbildung an nicht-Zielmoleküle oder ubiquitärem Glutathion erfolgen.<sup>[114-117]</sup>

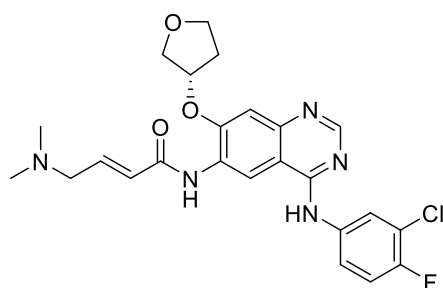
Ein Beispiel für einen kovalent-irreversibel bindenden Kinase-Inhibitor stellt der Naturstoff **Hypothemycin (28)** dar (siehe Abbildung 19). Hierbei handelt es sich um ein makrozyklisches Resorzinsäure-Lakton, dass als Multikinase-Inhibitor neben 17 Kinasen auch die FLT3-Kinase inhibiert. Die kovalente Bindung erfolgt durch den Angriff von Cys828, das dem DFG-Motiv vorgelagert ist, an das *cis*-Enon-Motiv des Inhibitors.<sup>[118]</sup>



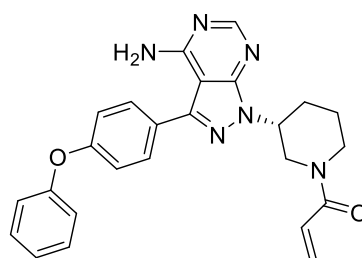
**Hypothemycin (28)**

**Abbildung 19:** Darstellung der Struktur des irreversibel-bindenden Kinase-Inhibitors Hypothemycin (28).

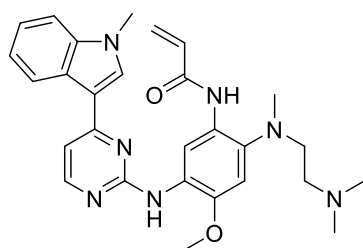
Bis heute sind vier irreversibel-bindende Tyrosinkinase-Inhibitoren für die Behandlung bestimmter Malignome zugelassen. **Afatinib (29)** (Gilotrif®) wurde 2013 zur Behandlung des nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinoms zugelassen und inhibiert kovalent den EGF- und den Her2-Rezeptor. **Ibrutinib (30)** (Imbruvica®) ist ein kovalenter Inhibitor der Brutons-Tyrosinkinase (BTK) und wurde zur Behandlung von B-Zell-Tumoren, wie der CLL, zugelassen. Der Inhibitor **Osimertinib (31)** (Tagrisso®) wird für die Behandlung von EGFR-mutiertem, metastasierendem, nicht-kleinzelligem-Lungenkarzinom verwendet und **Neratinib (32)** (Nerlynx®) wurde für die Behandlung von Her2-positivem Brustkrebs 2017 in den USA zugelassen. Die genannten Inhibitoren bilden jeweils eine Bindung zwischen dem Acrylamid-Motiv und einem Cystein der ATP-Bindetasche aus, wodurch die Zielkinase irreversibel gehemmt wird.<sup>[117]</sup>



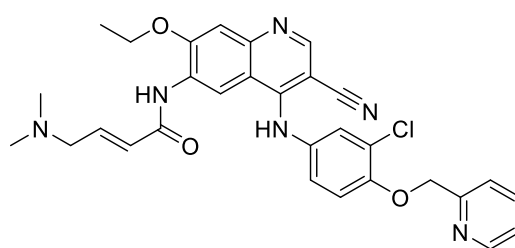
**Afatinib (29)**



**Ibrutinib (30)**



**Osimertinib (31)**



**Neratinib (32)**

**Abbildung 20:** Darstellung der Strukturen der zugelassenen irreversibel-bindenden Kinase-Inhibitoren **Afatinib (29)**, **Ibrutinib (30)**, **Osimertinib (31)** und **Neratinib (32)**.

---

## 2. Aufgabenstellung und Zielsetzung

---

### Rationales Design von kovalent-bindenden Proteasom- und FLT3-Inhibitoren

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Teilprojekte, wobei sich zwei Projekte mit dem Proteasom als Zielprotein und das Dritte mit der FLT3-Kinase als Zielprotein beschäftigen. Die einzelnen Teilprojekte werden im Folgenden näher erläutert.

Prinzipiell ist das jeweilige Ziel die Entwicklung von Designstrategien, die eine computer-gestützte Modellierung der potenziellen Wirkstoffe ermöglicht, gefolgt von der Hypothesen-entwicklung möglicher Struktur-Aktivitätsbeziehungen. Es sollen ausgewählte Leitstrukturen synthetisiert und anschließend biochemisch evaluiert werden. Hierbei gleicht das Vorgehen dem modernen Wirkstoffdesign, das auf dem interdisziplinären Zusammenspiel von computerbasierten, chemisch-synthetischen, physikalischen, biochemischen und biologischen Methoden basiert. Es wird das Ziel verfolgt, hochselektive und hochaktive Substanzen zu entwickeln, die *in vivo* optimale pharmakokinetische und -dynamische Eigenschaften sowie möglichst keine Nebenwirkungen aufweisen. Diese Ziele wurden auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt.

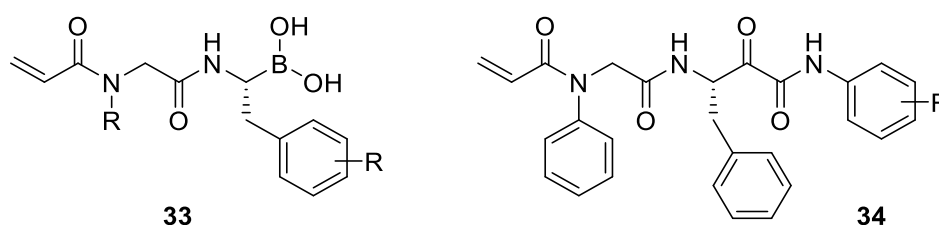
Das häufige Auftreten von Resistenz-vermittelnden Mutationen bei der zielgerichteten Tumorthherapie erzeugt einen stetigen Bedarf an neuen, verbesserten Inhibitoren. Hierbei hat sich gezeigt, dass die Verwendung kovalent bindender Inhibitoren Resistenzen gegenüber etablierten Therapien mit reversiblen Inhibitoren zu überwinden vermag.

### 2.1. Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und Evaluation von kovalent-reversibel bindenden Proteasom-Inhibitoren

Seit der Etablierung des Proteasoms als molekulares Ziel in der Tumorthherapie konnten zahlreiche Substanzen mit inhibitorischer Wirkung auf das 20S-Proteasom identifiziert und synthetisiert werden. Hierbei handelt es sich allerdings meist um die Klasse der kovalenten Inhibitoren, die mittels einer elektrophilen Kopfgruppe in der Lage sind, das katalytisch aktive Thr10y kovalent und vor allem (pseudo)-irreversibel zu binden. Ein systematischer Kopfgruppenvergleich durch Stein et al.<sup>[61]</sup> identifizierte die  $\alpha$ -Ketoamide als vielversprechendste Kopfgruppe für die Anwendung als Anti-Tumorwirkstoff. Dies beruht auf der hohen, selektiven inhibitorischen Aktivität und dem gleichzeitigen reversiblen Bindemechanismus. Die bereits in der Klinik angewendeten Inhibitoren **Bortezomib (4)**, **Carfilzomib (8)** und **Ixazomib (6)** binden hingegen (pseudo)-irreversibel, wodurch die Anwendung auf nicht solide Tumore beschränkt ist. In einem iterativen Design-/Syntheseprozess soll ausgehend von den Leitstrukturen **BSc2118 (3)** und **BSc4999 (12)** deren inhibitorische Aktivität sowie die Selektivität gegenüber der  $\beta$ 5-Untereinheit optimiert werden. Es sollen neue Ketoamid-Leitstrukturen computergestützt modelliert, synthetisiert und anschließend in biochemischen Experimenten evaluiert werden. Einzigartig gegenüber den bereits bekannten Inhibitoren ist hierbei die Möglichkeit die  $\alpha$ -Ketoamid-Inhibitoren in S1'-Richtung zu verlängern und somit weitere Selektivität zu erzeugen.

## 2.2. Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und Evaluation von dual-kovalenten Inhibitoren für das Immunoproteasom

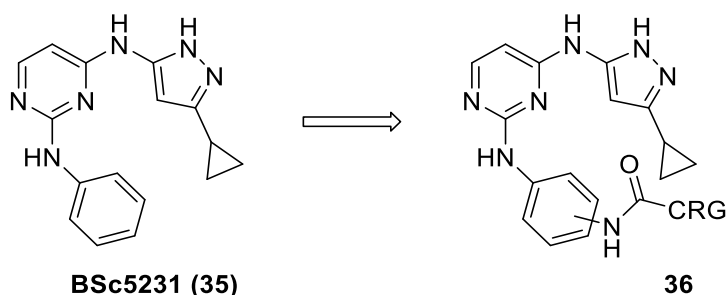
In letzter Zeit rückte das Immunoproteasom immer mehr in den Fokus der Proteasomforschung, mit der Hoffnung neue Möglichkeiten für die Therapie von Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Multiple Sklerose, aber auch für die Tumorthherapie entwickeln zu können. Für eine selektive Inhibition des Immunoproteasoms gegenüber dem konstitutiven Proteasoms kann sich die größere P1 Tasche der  $\beta 5$ -Untereinheit des iCPs, sowie eine Adressierbarkeit von Cys48, ebenfalls in der  $\beta 5$ -Untereinheit zu Nutze gemacht werden. Basierend auf, in einem Patent der Merck KGaA<sup>[119]</sup> veröffentlichten allgemeinen Strukturen **33**, sollen dual-kovalente Inhibitoren **34** entwickelt werden, die mit einem  $\alpha$ -Ketoamid-Motiv Thr1O $\gamma$  kovalent-reversibel binden und durch eine Acrylamid-Kopfgruppe ebenfalls Cys48 irreversibel binden (siehe Abbildung 20). Hierbei wird eine deutliche Steigerung der Selektivität gegenüber dem Immunoproteasom sowie der Inhibitionsstärke erhofft.



**Abbildung 21:** Von der Merck KGaA vorgestellte, dual-kovalent bindende schematische Struktur **33** und entwickelte, schematische Hybridstruktur **34**.

## 2.3. Synthese und Evaluation kovalent bindender FLT-3 Inhibitoren

Im dritten Projekt dieser Arbeit wird die Synthese von irreversiblen Inhibitoren der FLT3-Kinase als Wirkstoffe für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie beschrieben. Hierbei soll durch die Verwendung von irreversiblen Inhibitoren **36** der Resistenzbildung entgegengewirkt werden. Mit einem kovalenten *Docking* Ansatz wurden potenzielle Zielstrukturen im Rahmen der Dissertation von Dennis Bensinger im Arbeitskreis B. Schmidt identifiziert.<sup>[120]</sup> Eines der hierbei ermittelten Grundgerüste, das Bisaminopyrimidin-Grundgerüst BSc5231 (**35**), wurde als vielversprechende Leitstruktur für die Modifikation mit elektrophilen Kopfgruppen identifiziert (siehe Abbildung 22). In dieser Arbeit sollen die entsprechenden kovalent-irreversibel bindenden Inhibitoren **36** sowie deren reversible Gegenstücke synthetisiert und anschließend evaluiert werden.



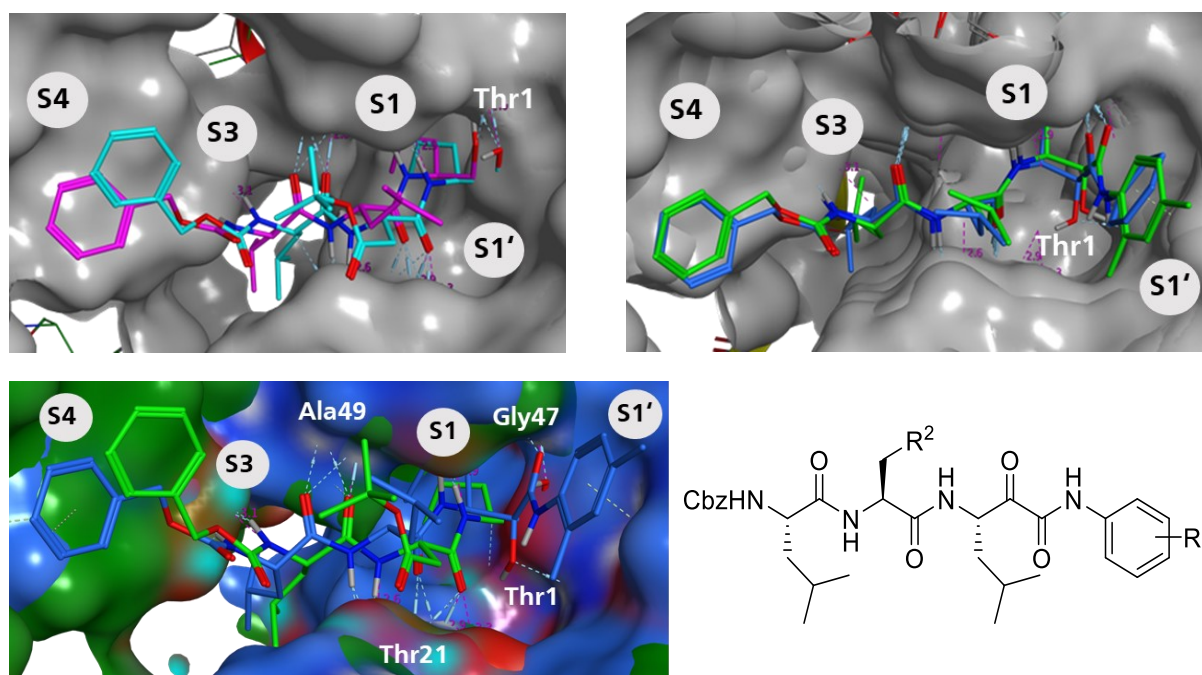
**Abbildung 22:** Leitstruktur BSc5231 (**35**) und Struktur der potenziellen irreversiblen Bisaminopyrimidin-basierten Inhibitoren **36**.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und pharmakologische Evaluation von kovalent-reversiblen Inhibitoren für das konstitutive Proteasom

##### 3.1.1. Molekulare Modellierung von kovalent-reversiblen $\alpha$ -Ketoamid-Inhibitoren mit S1'-Selektivität

Begonnen wurde die Optimierung der beiden Leitstrukturen **BSc2118** (**3**) und **BSc4999** (**12**) mit der Analyse der bekannten  $\gamma$ CP Kokristallstrukturen der peptidischen Aldehyde **MG132** (**2**) und **BSc2118** (**3**) sowie den peptidischen Ketoamiden **BSc2189** (**11**) und **BSc4999** (**12**), jeweils in der  $\beta$ 5-Untereinheit. Der  $\gamma$ CP kann hierbei aufgrund der hohen Sequenzhomologie und der einfach zugänglichen Kristalle als Surrogat genutzt werden. Die entsprechenden überlagerten Strukturen sind in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23:** Vergleich der Position der Aldehyde **MG132** (violett, **2**) und **BSc2118** (türkis, **3**) (oben links) sowie **BSc4999** (grün, **12**) und **BSc2189** (blau, **11**) (oben rechts) und **BSc2118** (grün, **3**) und **BSc4999** (blau, **12**) (unten links) in der  $\beta$ 5-Untereinheit des  $\gamma$ CP. Allgemeine Struktur der Inhibitoren (unten rechts).

Bei der genauen Betrachtung der jeweiligen Positionen der Inhibitoren im gebundenen Zustand an die  $\beta$ 5-Untereinheit fällt auf, dass die Peptidrückgrate sowie die N-terminalen Cbz-Schutzgruppen annähernd die gleiche Position einnehmen. Die Leucin- bzw. die Asp(OtBu)-Seitenketten in P1 bis P3 befinden sich in den Taschen S1 bis S3. Das Peptidrückgrat bildet hierbei starke Wasserstoffbrückenbindungen mit der  $\beta$ 5-Untereinheit aus, was eine optimale Positionierung der Kopfgruppe der Inhibitoren in Richtung des nukleophilen Thr1O $\gamma$  bedingt. Dies ist ebenfalls für die Cbz-Schutzgruppe, die sich in S4, nahe der  $\beta$ 6-Untereinheit befindet, der Fall. Ein Unterschied zwischen den Aldehyden und den Ketoamiden liegt darin, dass bei den Aldehyden die Hydroxylgruppe des Halbacetals, das bei dem Angriff an Thr1O $\gamma$  entsteht, das Oxyanion-Loch besetzt. Dieses wird normalerweise durch das Amid-Sauerstoffatom der Substrate ausgefüllt. Die Hydroxylgruppe des gebildeten Halbketals beim Angriff der Ketoamide, befindet sich allerdings auf der entgegengesetzten Seite, wodurch der

---

Carbonylsauerstoff das Oxyanion-Loch besetzt und die Konformation der Phenylamid-Gruppe eingeschränkt wird. Das Besondere bei **BSc2189 (11)** und **BSc4999 (12)** ist die Tatsache, dass der Phenylterminus der  $\alpha$ -Ketoamide hinter Thr1 und somit leicht in den gestrichenen Teil des Substratbindekanals zeigt. Hierbei ist die Dimethylphenyl-Gruppe von **BSc4999 (12)** im direkten Vergleich mit **BSc2189 (11)** um ca. 0.8 Å weiter in Richtung der gestrichenen Seite verschoben. Somit wird durch die Bindung von  $\alpha$ -Ketoamiden an das Thr1Oy der  $\beta$ 5-Untereinheit, im Gegensatz zu Epoxyketonen und Boronsäuren, eine simultane Belegung der gestrichenen und der nicht-gestrichenen Bindetasche, besonders von S1', möglich. Dies eröffnet die Möglichkeit, neuartige Selektivitäten durch die Adressierung der gestrichenen Seite mit optimierten  $\alpha$ -Ketoamiden zu generieren.

Da die Phenylgruppen bei **BSc2189 (11)** bzw. **BSc4999 (12)** jeweils nur geringfügig in die S1'-Tasche ragen, stellt sich somit die Frage, ob das Einführen eines Restes in *ortho*, *meta*- oder *para*-Stellung eine erweiterte Belegung der S1'-Tasche ermöglicht.

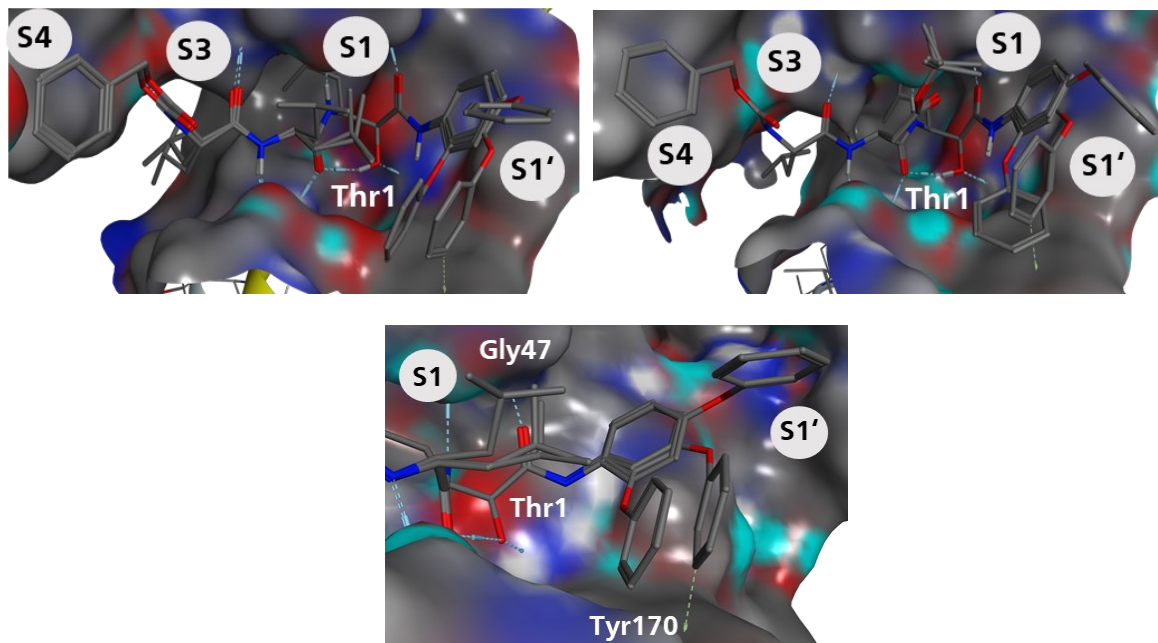
Die Modellierung neuer Liganden erfolgte durch einfache Modifikation der Kristallstruktur von gebundenem **BSc4999 (12)** mit der Modellierungssoftware *Molecular Operating Environment* (MOE). Hierauf wurde zurückgegriffen, da das kovalente *de novo Docking* von Tripeptiden nur für verschiedene *Redocking*-Ansätze von gelösten Kristallstrukturen etabliert ist, jedoch nicht für eine *de novo* Modellierung.

Bei der Analyse der Kristallstruktur von **BSc4999 (12)** wird deutlich, dass eine Erweiterung der Inhibitoren in die S'-Richtung, insbesondere die S1'-Tasche, durch große Substituenten, wie beispielsweise Phenyl-Ringe, erreicht werden kann. Die Anknüpfung an den bereits vorhandenen Phenylring sollte jedoch recht flexibel erfolgen und chemisch gut zugänglich sein, da bisher keine Berichte über Struktur-Aktivitätsbeziehungen aus der gestrichenen und der ungestrichenen Bindetasche vorhanden sind.

Für die Bestimmung der Belegung der gestrichenen Bindetasche wurde eine Phenylether-Gruppe gewählt. Diese zeichnet sich durch eine relativ einfache Zugänglichkeit in *ortho*, *meta* und *para* Position aus und besitzt des Weiteren diverse lokale Energieminima, die einen *induced fit* an die Tasche erlauben. Dies wird bei der Modifikation der Kokristallstruktur von **BSc4999 (12)** in der  $\beta$ 5-Untereinheit des yCP deutlich. Neben der Modifikation in Richtung der gestrichenen Seite, wurde außerdem der Austausch von Leucin durch Asp(OtBu) in P2 untersucht. Diese Idee beruht auf der gesteigerten Selektivität und der erhöhten inhibitorischen Aktivität des Aldehyd-basierten Inhibitors **BSc2118 (3)**, mit Asp(OtBu) in P2, im Vergleich mit **MG132 (2)**, bei dem das Peptidrückgrat aus drei Leucinen besteht. Da die  $\beta$ 5-Untereinheit des Proteasoms jedoch keine definierte S2-Tasche besitzt, könnte die gesteigerte Aktivität auch auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen sein, einhergehend mit einem gesteigerten Molekulargewicht, das zu einer Verdrängung eines Wassermoleküls aus der *active-site* führen kann. Aufgrund dessen wird eine Synthese der betreffenden Variationen mit Asp(OtBu) in P2 angestrebt.

Um die Strukturen zu modellieren wurden die Methylgruppen von **BSc4999 (12)** entfernt und mit Hilfe der *Builder*-Funktion von MOE die neuen Substituenten direkt an den Komplex angefügt. Der Austausch der Seitenkette in P2 von Leucin zu Asp(OtBu) erfolgte auf analoge Weise. Anschließend wurde die Energie der kovalent an das Proteasom gebundenen Inhibitoren minimiert. Die erhaltenen Strukturen sind in Abbildung 24 dargestellt.

Bei keiner der Substitutionen werden hierbei Konflikten mit der Oberfläche der Bindetasche beobachtet. Hervorzuheben ist, dass bei der Substitution der *meta*-Position mit einer Phenoxy-Gruppe, eine  $\pi$ -H-Interaktion durch eine *Edge-to-face* Wechselwirkung des Phenylethers mit Tyr170 in  $\beta$ 5 ausgebildet wird, die einen zusätzlichen energetischen Vorteil des Protein-Liganden-Komplexes ermöglichen kann.



**Abbildung 24:** Mögliche Positionen der *ortho*-*meta*- und *para*-Phenoxy substituierten Ketoamide mit Leu in P2 (links) und Asp(OtBu) in P2 (rechts) im Substratbindekanal der  $\beta$ 5-Untereinheit. Genauere Betrachtung der Lage der Phenylether (unten).

Da die Energieminimierung der virtuellen Liganden zeigt, dass jede der Möglichkeiten der Substitutionen toleriert wird und sinnvolle Ergebnisse liefert, wurden die genannten Varianten synthetisiert.

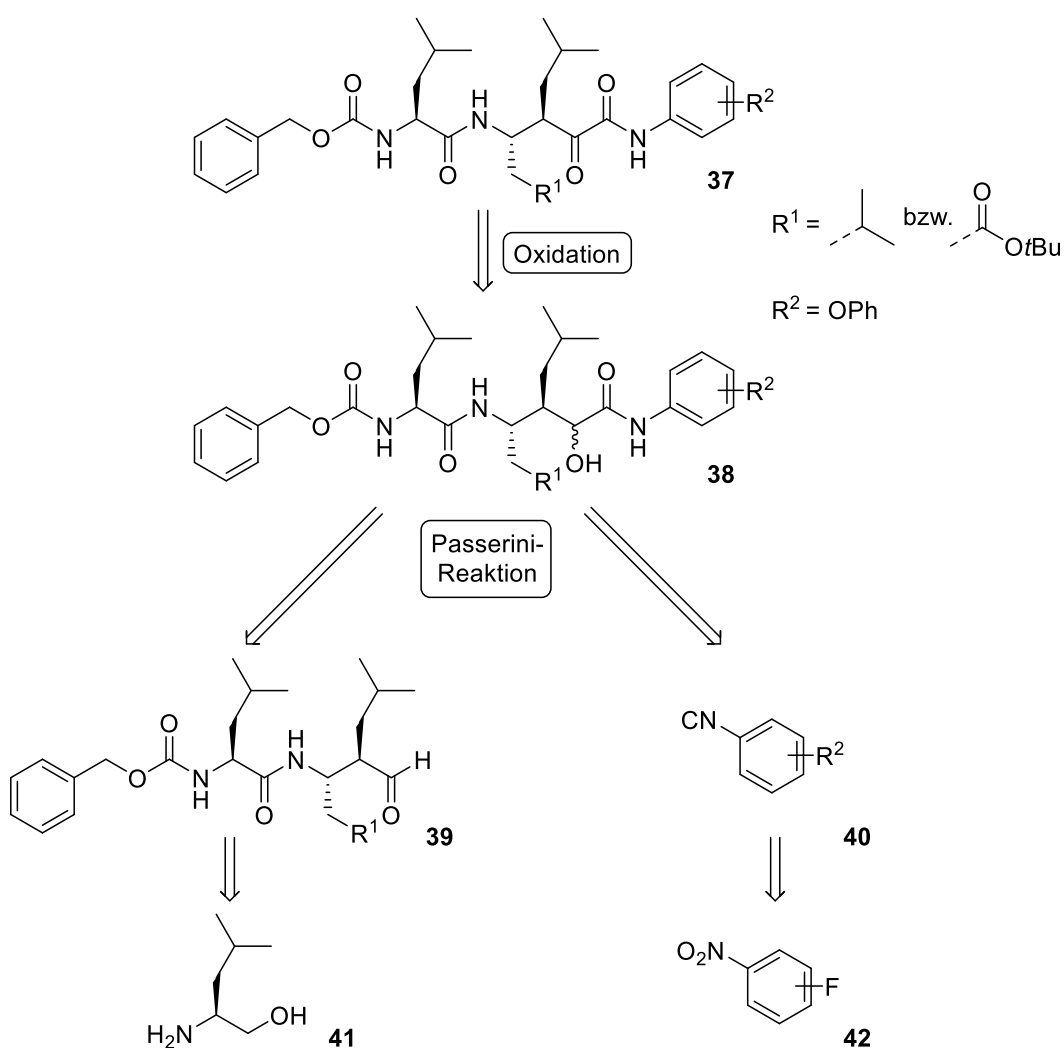
In Abschnitt 3.1.2. wird nun auf die Synthese und die biochemische Evaluation der  $\alpha$ -Ketoamide eingegangen.

### 3.1.2. Synthese und biochemische Evaluation von $\alpha$ -Ketoamid-basierten Proteasom-Inhibitoren

Die Untersuchung der Struktur-Aktivitätsbeziehungen erfolgte in einem iterativen Verfahren aus Synthese und biochemischer / biologischer Evaluation. Wegen der Komplexität des Projektes wurden einige der Synthesen im Rahmen der Masterarbeit von *Jannika Steinbacher* in der Arbeitsgruppe *B. Schmidt* durchgeführt.<sup>[121]</sup> Die Zellviabilitäten in diversen Zelllinien sowie die Inhibitionswerte der  $\beta 5c$  und  $\beta 5i$  Untereinheiten bei 100 nM Inhibitor wurden in Kooperation mit *Dennis Bensinger* ermittelt und sind ebenfalls Gegenstand seiner Dissertation.<sup>[120]</sup>

#### 3.1.2.1. Retrosynthese der Zielstrukturen

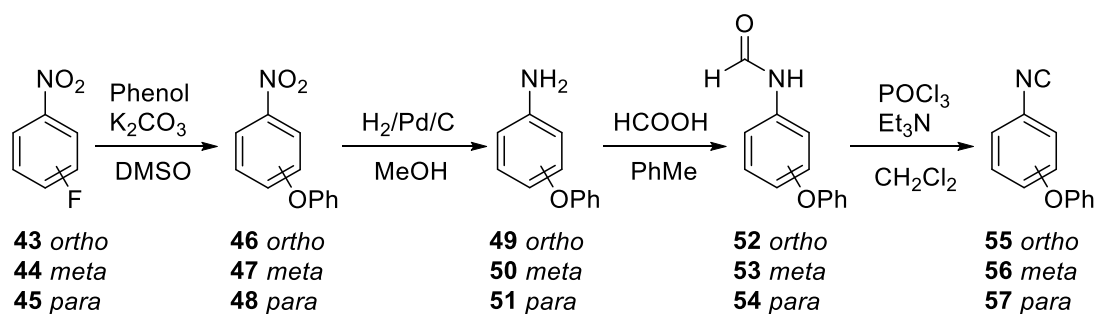
Schema 2 zeigt zunächst die schematische Retrosynthese der  $\alpha$ -Ketoamide.



**Schema 2:** Retrosynthetische Betrachtung der Synthese der  $\alpha$ -Ketoamid-basierten Proteasominhibitoren.

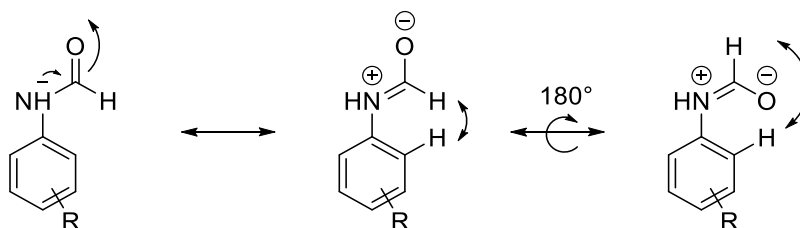
In einer linearen Synthesestrategie werden zunächst der Aldehyd **39** ausgehend von  $L$ -Leucinol (**41**) sowie das Isonitril **40** ausgehend von den entsprechenden fluorierten Nitroaromaten **42** dargestellt. Diese beiden Verbindungen können daraufhin in einer *Passerini*-Multikomponentenreaktion zum entsprechenden  $\alpha$ -Hydroxyamid **38** umgesetzt werden, das anschließend zum  $\alpha$ -Ketoamid **37** oxidiert wird.

### 3.1.2.2. Synthese der *ortho*-/ *meta*- und *para* Phenylether (55 – 57)



**Schema 3:** Syntheschema der Isonitrilbausteine 55 – 57.

Zunächst wurde mit der Synthese der Isonitrilbausteine 55 – 57 begonnen, die als Substituent jeweils einen Phenylether in *ortho*, *meta* oder *para* Substitution tragen und für die Exploration der gestrichenen Seite dienen (siehe Schema 3). Die Syntheseroute startete mit der Umsetzung der kommerziell erhältlichen entsprechenden Fluornitrobenzole 43 – 45 zu den entsprechenden Phenylethern 46 – 48 in einer nukleophilen aromatischen Substitution mit Phenol und Kaliumcarbonat als Base in DMSO. Die Reaktion der *ortho* und *para*-substituierten Edukte erfolgte bei 100 °C. Bei der Umsetzung des *meta*-Derivats 44 trägt die Nitrogruppe in der 2-Position nicht zu der Mesomeriestabilisierung der negativen Ladung bei und erschwert somit den Angriff des Nukleophils. Deshalb musste die Reaktionstemperatur hierbei auf 150 °C angehoben werden. Im folgenden Schritt wurden die Nitrophenylether 46 – 48 zu den entsprechenden Phenoxyanilinen 49 – 51 reduziert. Dies erfolgte unter Wasserstoffatmosphäre mit 10% Palladium auf Aktivkohle in Methanol bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Anilin-Derivate mittels Ameisensäure in Toluol in einem geschlossenen Gefäß zum Sieden erhitzt und somit die entsprechenden Formamide 52 – 54 erhalten. Bei der Betrachtung der jeweiligen <sup>1</sup>H- bzw. <sup>13</sup>C-NMR-Spektren fällt die Bildung von stabilen Rotameren bei Raumtemperatur auf. Dies liegt an dem partiellen Doppelbindungscharakter der C-N-Bindung, wodurch die Rotation gehindert wird. Schema 4 verdeutlicht das vorliegende Gleichgewicht. Die entsprechenden Protonen in *cis*- und *trans*-Konfiguration spalten jeweils als Dublett auf und besitzen somit unterschiedliche Kopplungskonstanten. Das Verhältnis der Rotamere liegt hierbei meist bei 1:1.



**Schema 4:** In Lösung vorliegendes Rotameren-Gleichgewicht der Formamide.

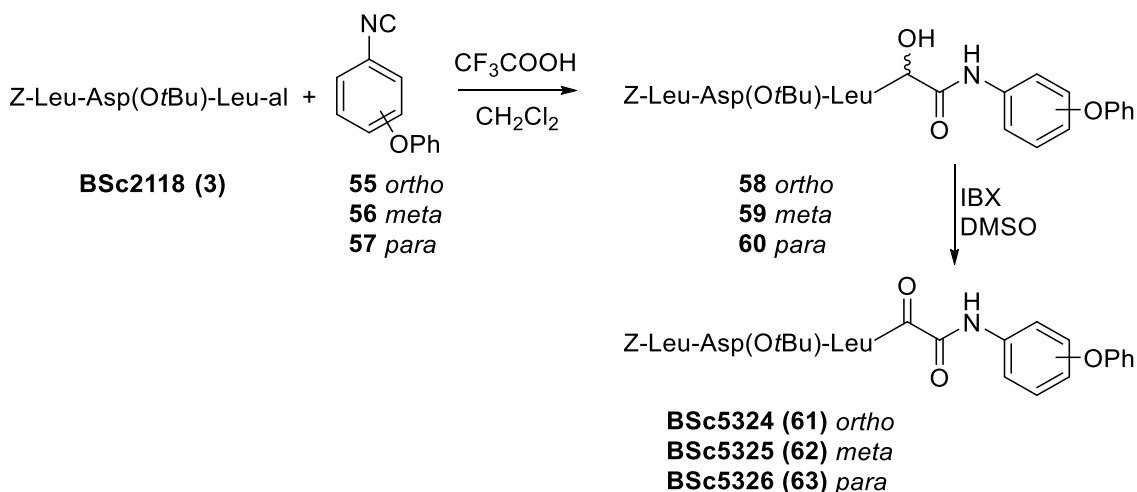
An die *N*-Formylierung schließt sich im letzten Schritt die Dehydratisierung der Formamide 52 – 54 zu den entsprechenden Isonitrilen 55 – 57 an. Hierfür wurden die Formamide in Dichlormethan mit Phosphorylchlorid und Triethylamin bei 0 °C umgesetzt. Die dargestellten Isonitrile 55 – 57 stellen nun die erste Komponente der sich anschließenden Multikomponentenreaktion dar.



Die Synthese des zweiten Bausteins, des Aldehyds **BSc2118 (3)**, erfolgte analog der Literatur mittels Standard Peptidkupplungen ausgehend von (*L*)-Leucinol (**41**).<sup>[51]</sup>

### 3.1.2.3. *Passerini*-Reaktion und Oxidation zu den $\alpha$ -Ketoamiden (**61** – **63**)

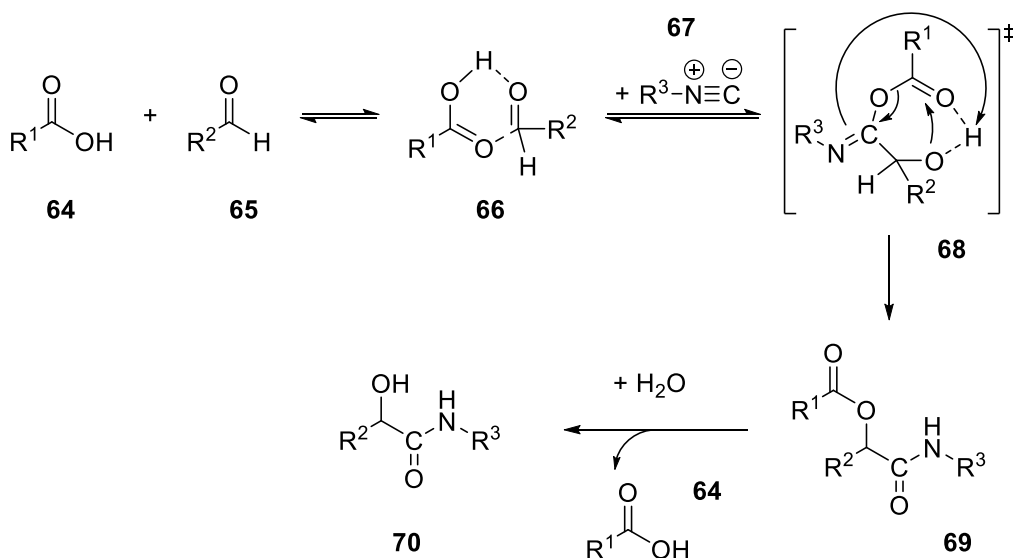
An die Synthese der Isonitrile **55** – **57** und des Aldehyds **3** schließen sich die Multi-komponentenreaktion nach *Passerini* sowie die anschließende Oxidation an (siehe Schema 5).



**Schema 5:** *Passerini*-Reaktion und anschließende Oxidation zu den  $\alpha$ -Ketoamiden **61** – **63**.

Zur Synthese der  $\alpha$ -Hydroxyamide **58** – **60** wurde das entsprechende Isonitril **55** – **57** und der Aldehyd **3** bei 0 °C in möglichst wenig Dichlormethan mit Trifluoressigsäure in einer *Passerini*-Reaktion umgesetzt. Die genannte Reaktion ist hierbei ein Schlüsselschritt der Inhibitoren-Synthese, da sie den modularen Aufbau der Zielstrukturen mittels einer divergenten Synthesestrategie erlaubt.

Seit der Entdeckung im Jahre 1921 durch *Mario Passerini*, hat sich die *Passerini*-Reaktion zu einem wertvollen Werkzeug der organischen Chemie entwickelt.<sup>[122]</sup> Der postulierte Mechanismus ist in Schema 6 dargestellt.



**Schema 6:** Postulierter Mechanismus der *Passerini*-Reaktion mit einer Carbonsäure **64**, einem Aldehyd **65** und einem Isonitril **67**. Modifiziert nach *Dömling* und *Ugi*.<sup>[123]</sup>

---

Der Mechanismus dieser Multikomponentenreaktion verläuft in aprotischen Lösemitteln wahrscheinlich über einen Übergangszustand unter Beteiligung aller drei Reaktionspartner. Im Auftaktschritt bildet sich zunächst Addukt **66** durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der Säurekomponente **64** und dem Aldehyd **65**. Es folgt eine  $\alpha$ -Addition des nukleophilen Carboxylatsauerstoffs und des elektrophilen Carbonylkohlenstoffs des Aldehyds an das Kohlenstoffatom des Isonitrils unter Ausbildung eines siebengliedrigen Übergangszustands **68**. Eine folgende intramolekulare Umacylierung liefert das stabile  $\alpha$ -Acyloxy-carboxamid **69**. Dieses wird unter Abspaltung der Carbonsäure **64** zum  $\alpha$ -Hydroxyamid **70** hydrolysiert.<sup>[123]</sup>

Neue quantenchemische Rechnungen liefern Grund zu der Annahme, dass es sich bei der PASSERINI-Reaktion sogar um eine Vierkomponentenreaktion handeln könnte, an deren geschwindigkeitsbestimmendem Schritt ein weiteres Molekül der Carbonsäurekomponente **64** beteiligt ist.<sup>[124]</sup> Des Weiteren besteht die Möglichkeit, anstelle von Aldehyden primäre Alkohole zu verwenden und diese *in situ* durch Luftsauerstoff zu oxidieren. Zudem lässt sich mittels chiraler Katalysatoren der stereochemische Verlauf der Reaktion beeinflussen.<sup>[125-126]</sup>

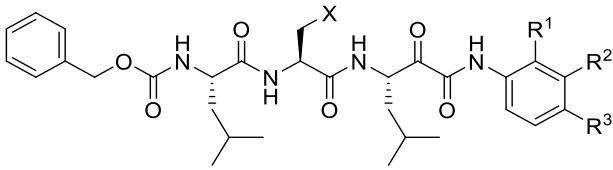


Im letzten Syntheseschritt wurden die erhaltenen  $\alpha$ -Hydroxyamide **58** – **60** mittels der hypervalenten Iodverbindung IBX in DMSO zu den entsprechenden  $\alpha$ -Ketoamiden **61** – **63** oxidiert.

An die Synthese der Derivate schließt sich im folgenden Abschnitt deren biochemische Evaluation an.

### 3.1.2.4. Biochemische Evaluation der Phenylether 61 – 63 als Proteasominhibitoren

Im Anschluss an die Synthese wurden die entwickelten Inhibitoren auf ihre Zytotoxizität und ihre Inhibition am isolierten Enzym untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1:** Übersicht der ermittelten Inhibitionswerte der Proteasominhibitoren.

										
Substanz	X	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> MV4-11 / nM	Relative Inhibition / %				
						c = 100 nM		c = 1 μM		
						β5c	β5i	β5c	β5i	β2c β1c
Btz (4)	-	-	-	-	34 ± 5	89	85	98	98	5 80
Cfz (8)	-	-	-	-	3.6 ± 1.8	86	43	96	91	37 -18
BSc4999 (12)		Me	H	Me	19 ± 3	64	33	92	74	9 -26
BSc5321 (71)		OPh	H	H	203 ± 22	12	8	32	7	-4 -7
BSc5322 (72)		H	OPh	H	18 ± 3	56	23	81	31	9 0
BSc5323 (73)		H	H	OPh	45 ± 3	25	5	63	23	2 -3
BSc5327 (74)		H	H	H	46 ± 6	57	48	91	76	-8 12
BSc5328 (75)		Me	H	Me	46 ± 1	43	36	88	69	-10 11
BSc5324 (61)		OPh	H	H	76 ± 14	28	18	59	7	2 -12
BSc5325 (62)		H	OPh	H	36 ± 5	53	43	84	31	9 -15
BSc5326 (63)		H	H	OPh	68 ± 9	41	40	38	22	-7 -24

Zur ersten Einschätzung der neuen Modifikationen der Leitstruktur **BSc4999 (12)** wurden zunächst die Konzentrationen der halbmaximalen Inhibition der Zellviabilität (IC<sub>50</sub>) in MV4-11-Zellen sowie Ein-Punkt-Messungen der Inhibition des isolierten konstitutiven und immuno-Proteasoms bei 100 nM und 1 μM durchgeführt. Die Bestimmung der relativen Inhibition bei zwei verschiedenen Konzentrationen soll hierbei Steigungseffekte verhindern. Des Weiteren wurden die Selektivitäten gegenüber β2c und β1c bei 1 μM Inhibitor bestimmt. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 1 dargestellt.

Zunächst werden die Zytotoxizitäten der mit Leucin in P2 versehenen α-Ketoamide mit ihren verschiedenen substituierten Phenylethern in *ortho*- (**BSc5321 (71)**, IC<sub>50</sub> = 203 ± 22 nM), *meta*- (**BSc5322 (72)**, IC<sub>50</sub> = 18 ± 3 nM) und *para*-Stellung (**BSc5323 (73)**, IC<sub>50</sub> = 45 ± 3 nM) betrachtet. Hierbei zeigt sich, dass prinzipiell alle Substitutionspositionen toleriert werden, die Einführung der Phenylether-Gruppe in *meta*-Stellung zeigt jedoch die stärkste Wirkung. Des

Weiteren ist die zytotoxische Aktivität von **BSc5322 (72)** deutlich stärker als die des zugelassenen Inhibitors **Bortezomib (4)** ( $IC_{50} = 34 \pm 5$  nM). Die Aktivitäten im zellulären Assay korrelieren hierbei mit der Bestimmung der relativen Inhibition gegenüber isoliertem cCP. Hier zeigt ebenfalls die *meta*-Substitution die höchste Aktivität ( $\beta 5c$ -Inhibition = 56% ( $c = 100$  nM) und 81% ( $c = 1$   $\mu$ M)). Wie auch bei der Leitstruktur **BSc4999 (12)** ist auch bei den neuen Derivaten die Inhibition von  $\beta 5c$  gegenüber  $\beta 5i$  deutlich erhöht.

In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe B. Schmidt konnte durch den direkten Vergleich von **MG132 (2)** und **BSc2118 (3)** gezeigt werden, dass die Inhibitionsstärke von Peptidaldehyden durch den Austausch der Aminosäure in P2 von Leucin gegen den *tert*-Butylester der Asparaginsäure-Seitenkette (AspOtBu) gesteigert wird.<sup>[51]</sup> Allerdings besitzt die  $\beta 5$ -Untereinheit jedoch keine definierte P2-Tasche, weshalb die gesteigerte inhibitorische Aktivität vermutlich auf unspezifische, hydrophobe Wechselwirkungen durch die vergrößerte Moleküloberfläche zurückzuführen ist. Eine daraus resultierende Verdrängung von Wasser-Molekülen in der P2-Tasche ist ebenfalls denkbar.

Dieser Effekt kann auch durch eine stärkere Zytotoxizität von **BSc2118 (3)** in MV4-11-Zellen ( $IC_{50} = 123 \pm 12$  nM) gegenüber **MG132 (2)** ( $IC_{50} = 131 \pm 12$  nM) beobachtet werden und auch die Inhibition gegen  $\beta 5c$  (54% bzw. 90%) und  $\beta 5i$  (11% bzw. 72%) ist erhöht (siehe Tabelle 1).

Um die Frage zu klären, ob dieser Effekt auch bei den  $\alpha$ -Ketoamiden zu beobachten ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit die entsprechenden Derivate synthetisiert, bei denen in P2 die Leucin-Seitenkette durch AspOtBu ausgetauscht wurde.

Bei den entsprechenden Inhibitoren **BSc5324 (61)** – **BSc5328 (75)** lässt sich allerdings für fast alle Substanzen eine geringere zytotoxische Aktivität im Vergleich mit den entsprechenden Leucin-Derivaten beobachten. Die Trends sind allerdings sehr ähnlich. Das *meta*-Phenylether substituierte Ketoamid **BSc5325 (62)** ( $IC_{50} = 36 \pm 5$  nM) zeigt in der Reihe die höchste Zytotoxizität im Vergleich mit dem *ortho*- (**BSc5324 (61)**  $IC_{50} = 76 \pm 14$  nM) und *meta*-substituierten Ketoamid (**BSc5326 (63)**  $IC_{50} = 68 \pm 9$  nM). Allerdings ist hierbei im Gegensatz zu den Leucin-Derivaten das *ortho*-substituierte Ketoamid aktiver. Interessanterweise zeigt das Dimethyl-substituierte Ketoamid **BSc5328 (75)** eine ähnlich starke zytotoxische Aktivität wie das unsubstituierte Derivat **BSc5327 (74)**. Beide inhibieren allerdings deutlich schlechter als das Leucin-Derivat **BSc4999 (12)**. Betrachtet man die relative Inhibition von  $\beta 5c$  durch die Inhibitoren, so wird erkennbar, dass die in *ortho* und *para* substituierten Ketoamide mit der Asp(OtBu)-Seitenkette aktiver sind als ihre Leucin-Analoga. Die Inhibition durch die *meta*-Substitution ist allerdings vergleichbar und ebenfalls die höchste der Serie. Allerdings ist die Isoform-Selektivität von  $\beta 5c$  gegen  $\beta 5i$  für die AspOtBu-Derivate deutlich verringert, insbesondere für **BSc5325 (62)** im Vergleich mit **BSc5322 (72)** (43% zu 23% Inhibition).

Die geringere Aktivität der  $\alpha$ -Ketoamide mit AspOtBu in P2 im Gegensatz zu den entsprechenden Aldehyden, lässt sich möglicherweise durch eine leichte Verschiebung im Peptidrückgrat erklären, die in den vorgestellten Kristallstrukturen zu beobachten ist (vergleiche Abbildung 23). Somit könnte die Phenylamid-Gruppe die gleiche räumliche Nähe des elektrophilen Kohlenstoffs zu Thr10y, wie bei den Aldehyden, beeinflussen und somit einen *induced-fit* mit diesem Mechanismus nicht mehr zulassen. Dies resultiert in einer schlechteren Positionierung des sterisch anspruchsvollen *tert*-Butylrests.

Betrachtet man die Selektivitäten der synthetisierten Inhibitoren gegenüber der  $\beta 1c$  und  $\beta 2c$ -Untereinheit, so ist im Gegensatz zu **Bortezomib (4)** (80% rel. Inhibition von  $\beta 1c$  ( $c = 1$   $\mu$ M))

---

und **Carfilzomib (8)** (37% rel. Inhibition von  $\beta 2c$  ( $c = 1 \mu M$ )) keine nennenswerte Inhibition der beiden Untereinheiten zu beobachten.

Da im direkten Vergleich mit **BSc4999 (12)** ( $IC_{50} = 19 \pm 3 \text{ nM}$ ) die zelluläre Aktivität von **BSc5322 (72)** jedoch nur leicht erhöht ist, wird im nächsten Schritt die Wiedereinführung der Methylgruppen von **BSc4999 (12)** in *ortho*- und *para*-Position zum Ketoamid-NH, in Kombination mit der *meta*-Phenylether Substitution kombiniert. Da sich bei der molekularen Modellierung allerdings keine eindeutigen Hinweise auf ein besonders aussichtsreiches Substitutionsmuster ergaben, wurden verschiedene Kombinationen synthetisiert. Die entsprechenden Syntheseschritte werden im folgenden Abschnitt genauer beschrieben.

### 3.1.2.5. Synthese der Methyl-substituierten *meta*-Phenylether-Derivate 119 – 124

Im nächsten Schritt sollte die Wiedereinführung der Methylgruppen von **BSc4999** (**12**) in *ortho*- und *para*-Position in Kombination mit der *meta*-Phenylether Substitution untersucht werden. Die ausgewählten Isonitril-Zielstrukturen der entsprechenden Phenylether sind in Abbildung 25 dargestellt.

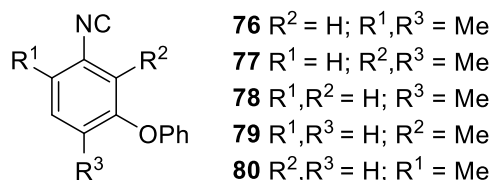
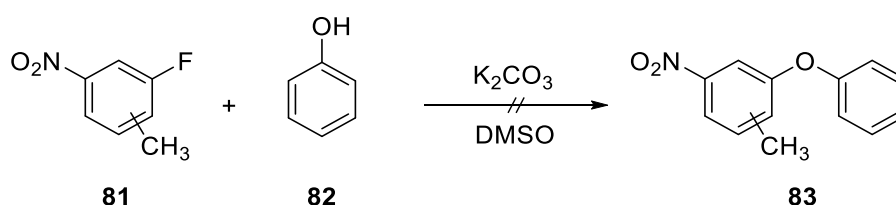


Abbildung 25: Ausgewählte Isonitril-Zielstrukturen **76** – **80**.

Für die Synthes der Methyl-substituierten Phenylether mit den verschiedenen Substitutionsmustern wurde zunächst eine ähnliche Syntheseroute wie bei den einfachen Phenylethern aus Abschnitt 3.1.2.2. versucht (siehe Schema 7).

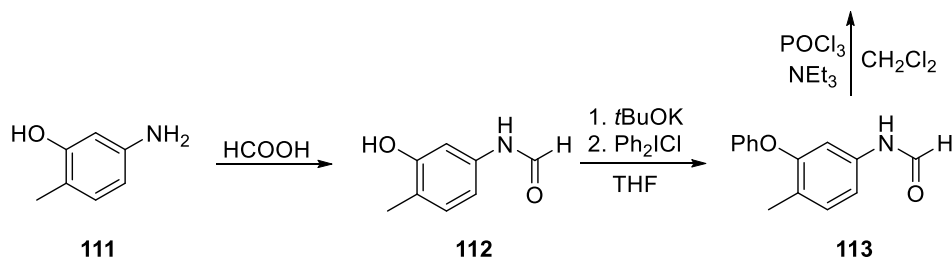
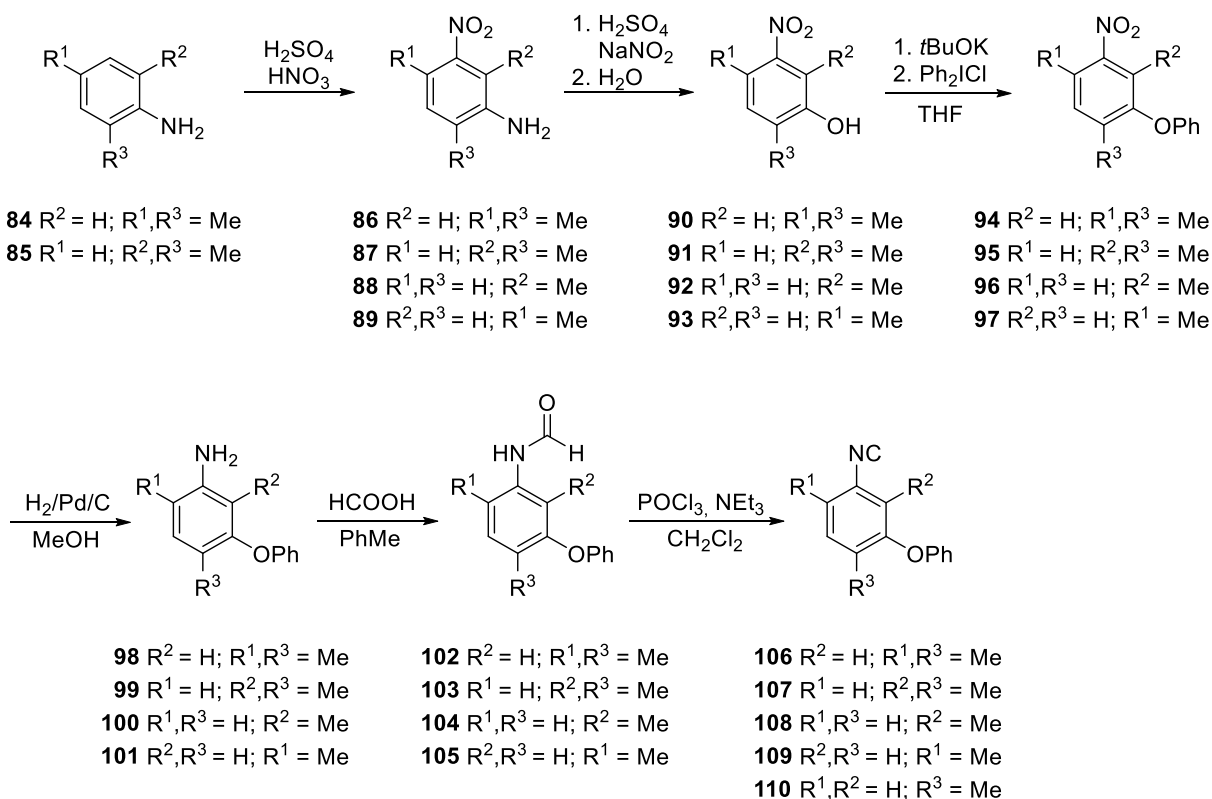


Schema 7: Durchgeführte Reaktion für die Synthese der methylierten Phenylether.

Allerdings konnte bei keinem der verschiedenen Edukte eine nennenswerte Reaktion zum gewünschten Produkt beobachtet werden. Teilweise war das entsprechende Produkt in Spuren erkennbar, jedoch kam es bei keinem der Versuche zu einer ausreichenden Umsetzung. Eine Variation der Reaktionsbedingungen, in Form verschiedener Basen, Lösemittel und Reaktions-temperaturen, war ebenfalls nicht zielführend. Bei einer Erhöhung der Temperatur auf über 150 °C war lediglich eine Zersetzung der Edukte zu beobachten. Vermutlich wird die elektronische Struktur der Edukte durch die Methylgruppen soweit verändert, dass eine nukleophile aromatische Substitution in *meta*-Stellung zur Nitrogruppe noch weniger begünstigt ist, als es bei dem unsubstituierten *meta*-Fluornitrobenzol **44** bereits der Fall war. Aus diesem Grund wurde eine neue Synthesestrategie gewählt. Für die Knüpfung der Etherbindung wurde nun ein alternativer Ansatz mittels der hypervalenten Iodverbindung Diphenyliodoniumchlorid gewählt. Die durchgeführten Synthesen sind in Schema 8 dargestellt.

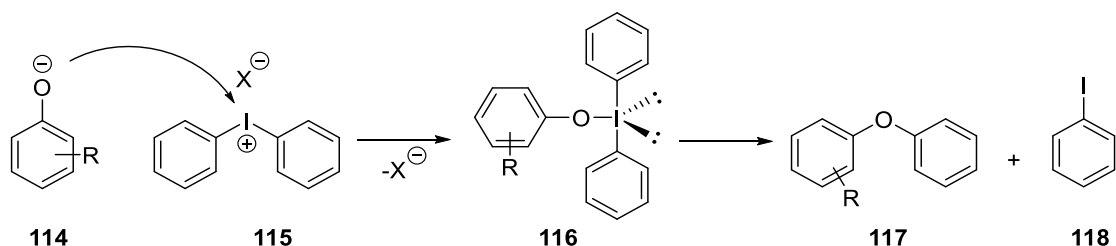
Für die Synthese der beiden Dimethyl-Derivate **106** und **107** wurde mit den kommerziell erhältlichen Dimethyl-Anilinen **84** und **85** begonnen. Diese wurden zunächst zu den entsprechenden Nitroanilinen **86** und **87** mit einer Mischung aus Schwefel- und Salpetersäure nitriert. Die entsprechenden Nitroaniline für die Monomethyl-Derivate **109** und **110** sind kommerziell zugänglich und treten im folgenden Schritt in die Syntheseroute ein. Die methylierten Nitroaniline **86** – **89** wurden anschließend in einer klassischen Phenolverkochung

zu den entsprechenden Nitrophenolen **90** – **93** umgesetzt. Hierfür wurde zunächst mit Natriumnitrit und Schwefelsäure das Diazoniumsalz gebildet, dass anschließend sauer zum Phenol verkocht wurde.



**Schema 8:** Syntheseroute zu den Methyl-substituierten Phenylethern **106** – **110**.

An die Synthese der Nitrophenole **90** – **93** schließt sich die Phenylierung zu den Phenylethern **94** – **97** an. Hierfür wird die phenolische Hydroxyl-Gruppe zunächst mittels *t*BuOK deprotoniert um anschließend die hypervalente Iodverbindung Diphenyliodoniumchlorid in einer  $S_N2$ -Reaktion anzugreifen. Der detaillierte Mechanismus ist in Schema 9 dargestellt.



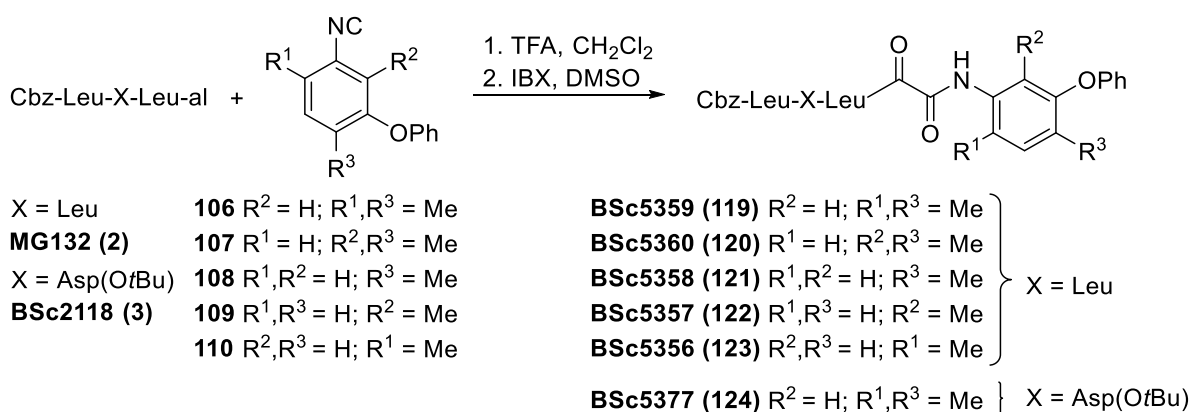
**Schema 9:** Genereller Reaktionsmechanismus von Diaryliodoniumsalzen mit Phenolaten.<sup>[127]</sup>

Bei den hypervalenten Iod(III)-Verbindungen ist die lineare drei-Zentren, vier-Elektronen-Bindung stark polarisiert und somit länger und schwächer im Vergleich mit einer normalen kovalenten Bindung. Wegen der hypervalenten Eigenschaften dieser Bindung besitzen Iod(III)-Verbindungen elektrophilen Charakter. Somit können die Diaryliodoniumsalze mit einer Vielzahl von Nukleophilen reagieren. Die extreme Reaktivität dieser Verbindungen wird hierbei mit der sogenannten *hyperleaving group ability* der gebildeten Aryliodide beschrieben. Die Iod(III)-Verbindung **115** reagiert zunächst in einer S<sub>N</sub>2-Reaktion mit dem Phenolat **114** unter Ligandenaustausch am Iod(III). In einer anschließenden reduktiven Eliminierung bilden sich das gewünschte substituierte Aren **117** sowie das entsprechende Iodaren **118**.<sup>[127]</sup>

Nach der erfolgreichen Synthese der Nitrophenylether **94** – **97** wurden diese anschließend zu den entsprechenden Aminen **98** – **101** reduziert. Dies erfolgte unter Wasserstoffatmosphäre mit 10% Palladium auf Aktivkohle in Methanol bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Anilin-Derivate mittels Ameisensäure in Toluol in einem geschlossenen Gefäß zum Sieden erhitzt und somit die entsprechenden Formamide **102** – **105** erhalten. Auch hierbei konnte das Auftreten stabiler Rotamere in Lösung bei Raumtemperatur analog zu Abschnitt 3.1.2.2. beobachtet werden. Die erhaltenen Formamide **102** – **105** wurden im nächsten Schritt mittels Phosphorylchlorid unter basischen Bedingungen zu den Isonitrilen **106** – **109** dehydratisiert.

Die Synthese von Isonitril **110** startete ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Aminophenol **111**. Dieses wurde zunächst mittels Ameisensäure zum Formamid **112** umgesetzt und anschließend wurde mit Diphenyliodoniumchlorid der Phenylether **113** synthetisiert. Dieser wurde analog zu den Formamiden **102** – **105** mittels Phosphorylchlorid und Triethylamin in Dichlormethan zu Isonitril **110** dehydratisiert.

Die erhaltenen Methyl- und Phenylether-substituierten Isonitrile **106** – **110** wurden anschließend wie bereits in Abschnitt 3.1.2.3. in einer *Passerini*-Reaktion mit anschließender Oxidation zu den entsprechenden  $\alpha$ -Ketoamiden **119** – **124** umgesetzt. Hierbei wurde sich ausgehend von den biochemischen Ergebnissen aus Abschnitt 3.1.2.4. auf das Peptidrückgrat von **BSc4999** (**12**) mit Leucin in P2 beschränkt. Lediglich bei der vielversprechendsten Verbindung der generierten Derivate, wurde auch die Verbindung mit Asp(OtBu) in P2 synthetisiert. Die Synthese der genannten  $\alpha$ -Ketoamide ist im folgenden Schema dargestellt.



**Schema 10:** *Passerini*-Reaktion und anschließende Oxidation zu den  $\alpha$ -Ketoamiden **119** – **124**.

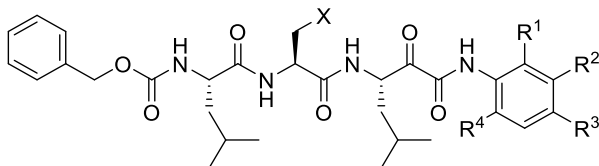
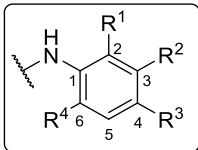


An die Synthese der Derivate schließt sich im folgenden Abschnitt erneut die biochemische Evaluation an.



### 3.1.2.6. Biochemische Evaluation der Methylderivate

Im Anschluss an die Synthese wurden die modifizierten Inhibitoren erneut auf ihre Zytotoxizität und ihre Inhibition am isolierten Enzym untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2:** Übersicht der ermittelten Inhibitionswerte der Proteasominhibitoren **119** – **124**.

<div><div></div><div></div></div>												
Substanz	X	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	IC <sub>50</sub>	Relative Inhibition / %					
						MV4-11	c = 100 nM		c = 1 μM			
						/ nM	β5c	β5i	β5c	β5i	β2c	β1c
Btz (4)	-	-	-	-		34 ± 5	89	85	98	98	5	80
Cfz (8)	-	-	-	-		3.6 ± 1.8	86	43	96	91	37	-18
BSc4999 (12)		Me	H	Me	H	19 ± 3	64	33	92	74	9	-26
BSc5322 (72)		H	OPh	H	H	18 ± 3	56	23	81	31	9	0
BSc5359 (119)		H	OPh	Me	Me	19 ± 1	46	12	59	10	10	-10
BSc5360 (120)		Me	OPh	Me	H	26 ± 8	20	9	53	16	4	-33
BSc5358 (121)		H	OPh	Me	H	23 ± 2	49	28	69	15	4	-4
BSc5357 (122)		Me	OPh	H	H	27 ± 8	41	29	78	30	5	-10
BSc5356 (123)		H	OPh	H	Me	16 ± 1	26	19	75	48	9	-2
BSc5325 (62)		H	OPh	H	H	36 ± 5	53	43	84	31	9	-15
BSc5377 (124)		H	OPh	Me	Me	297 ± 27	33	28	52	17	11	-4

Das 1,3,4,6-substituierte Ketoamid **BSc5359 (119)** zeigt eine ähnlich starke zelluläre Aktivität (IC<sub>50</sub> = 19 ± 1 nM) wie **BSc5322 (72)**. Bei der Inhibition des isolierten Proteasoms ist allerdings eine gesteigerte Selektivität von β5c gegenüber β5i zu beobachten. Das 1,2,3,4-substituierte Ketoamid **BSc5360 (120)** besitzt hingegen sowohl eine geringere zelluläre Inhibition (IC<sub>50</sub> = 26 ± 3 nM) als auch eine erniedrigte relative Inhibition von β5c und β5i. Die Einführung der Monomethyl-Substituenten in 2-Position (**BSc5357 (122)**, IC<sub>50</sub> = 27 ± 8 nM) und 4-Position (**BSc5358 (121)**, IC<sub>50</sub> = 23 ± 2 nM) verringert ebenfalls die zytotoxische Aktivität sowie die Selektivität der Inhibition von β5c gegenüber β5i. Die Monomethyl-Substitution in Position 6 hingegen führt zu einer etwas gesteigerten zytotoxischen Aktivität (**BSc5356 (123)**, IC<sub>50</sub> = 16 ± 1 nM), allerdings ist die Inhibition von β5c und β5i deutlich geringer, was auf eventuelle *off-target*-Effekte schließen lässt. Auffallend ist die Tatsache, dass im Gegensatz zu **BSc5359 (119)**, die Wiedereinführung der Methylgruppen in Position 4 und 6 in Kombination mit dem von **BSc2118 (3)** abgeleiteten Asp(OtBu)-Rückgrat, die zelluläre Aktivität deutlich verringert (**BSc5377 (124)**, IC<sub>50</sub> = 297 ± 27 nM). Da die Werte für die

---

Inhibition des isolierten cCP deutlich weniger gesunken sind, könnte dieser Effekt auf eine schlechtere Penetration der Zellmembran, bzw. eine Einlagerung in diese hindeuten. Dieser Effekt konnte bereits bei der Optimierung Cbz-geschützter Dicyclohexyl-basierter Proteasom-inhibitoren von *Overkleeft et al.* beobachtet werden.<sup>[32]</sup> Das Problem konnte durch den Austausch der Cbz-Schutzgruppe durch eine Solvens-exponierte Morpholin-Gruppe gelöst werden, wodurch die Löslichkeit und schlussendlich die zelluläre Aktivität deutlich gesteigert werden konnte. Bei sämtlichen neusynthetisierten Derivaten konnte außerdem erneut keine nennenswerte Inhibition der  $\beta 2c$  und  $\beta 1c$  Untereinheit beobachtet werden. Dies lässt wiederum auf eine sehr gute Selektivität der Substanzen schließen. Als attraktivste Substanz geht aus dieser Reihe das 1,3,4,6-substituierte  $\alpha$ -Ketoamid **BSc5359 (119)** hervor, dass eine ähnlich starke zytotoxische Aktivität wie **BSc5322 (72)** aufweist und ein verbessertes Selektivitätsprofil von  $\beta 5c$  gegenüber  $\beta 5i$  zeigt.

An die Optimierung des Phenylamidterminus, der die S1'-Seite des Substratbindekanals der  $\beta 5c$  Untereinheit des Proteasoms adressiert, schließt sich in Abschnitt 3.1.2.7. die Optimierung der N-terminalen Schutzgruppe an.

### 3.1.2.7. Optimierung des *N*-Terminus – Molekulare Modellierung und Synthese

Im nächsten Optimierungsschritt wurde der Austausch der Cbz-Schutzgruppe in P4 der  $\beta 5c$ -Untereinheit, in direkter Nachbarschaft zur  $\beta 6$ -Untereinheit, untersucht. Bei der Analyse der Cbz-Schutzgruppe in P4 zeigt sich, dass diese keine gezielten Wechselwirkungen mit Aminosäureresten der  $\beta 5$ - oder  $\beta 6$ -Untereinheit eingeht. Ein Austausch der Cbz-Gruppe könnte somit ebenfalls zu einer höheren Aktivität führen. Es ist anzunehmen, dass eine geringere Anzahl frei drehbarer Bindungen sowie weitere polare Interaktionen die Potenz und Zellpermeabilität der Inhibitoren verbessern. Dies könnte zu einem alternativen *induced-fit* Mechanismus der Moleküle in der *active-site* führen. Hierfür wurden drei verschiedene P4-Gruppen ausgewählt, die von bereits bekannten Proteasominhibitoren, die jedoch eine andere Position im Substratbindekanal einnehmen, inspiriert sind. Die verwendeten P4-Gruppen sind in Abbildung 26 dargestellt.

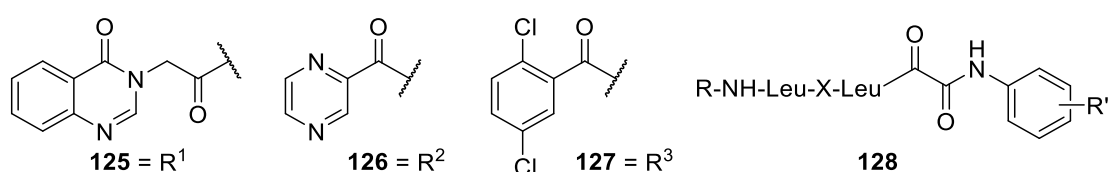


Abbildung 26: Ausgewählte P4-Gruppen für die Variation der *N*-terminalen Cbz-Schutzgruppe.

**Bortezomib (4)** trägt *N*-terminal eine 2-Pyrazinamid-Gruppe **126** nach P2, die ähnlich der 2,5-Dichlorobenzamid-Gruppe **127** von **Ixazomib (6)** ist, wobei sich die sterischen und elektronischen Auswirkungen durchaus unterscheiden können. Neben den monozyklischen Varianten **126** und **127** wurde außerdem getestet, ob auch Bizyklen in P4 toleriert werden. Hierfür wurde eine Quinazolinon-Gruppe **125** ausgewählt, die über eine Acetyl-Gruppe an P3 angeknüpft wird. Diese Gruppe leitet sich von einer *N*-terminalen Naphthyridinon-Gruppe ab, die von *Micale et al.* im Rahmen der Entwicklung von dipeptidischen Boronsäure-Inhibitoren für das Proteasom eingeführt wurden.<sup>[128]</sup>

Für eine Einschätzung der Änderungen, die durch den Austausch der *N*-terminalen Cbz-Schutzgruppe hervorgerufen werden, wurde die Kokristallstruktur von **BSc4999 (12)**, wie schon bei der Exploration der Phenylethersubstitutionen, als Startpunkt für die molekulare Modellierung verwendet. **BSc4999 (12)** wurde mit den Gruppen **125** – **127** modifiziert und anschließend wurde eine Energieminimierung der Liganden durchgeführt. Die erhaltenen Strukturen in der  $\beta 5$ -Untereinheit sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

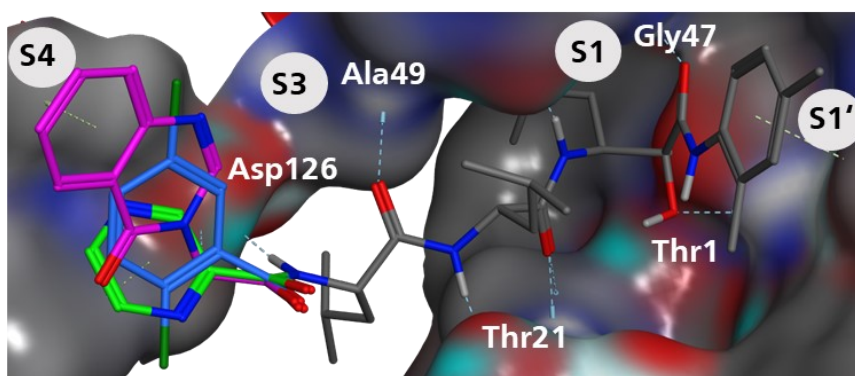
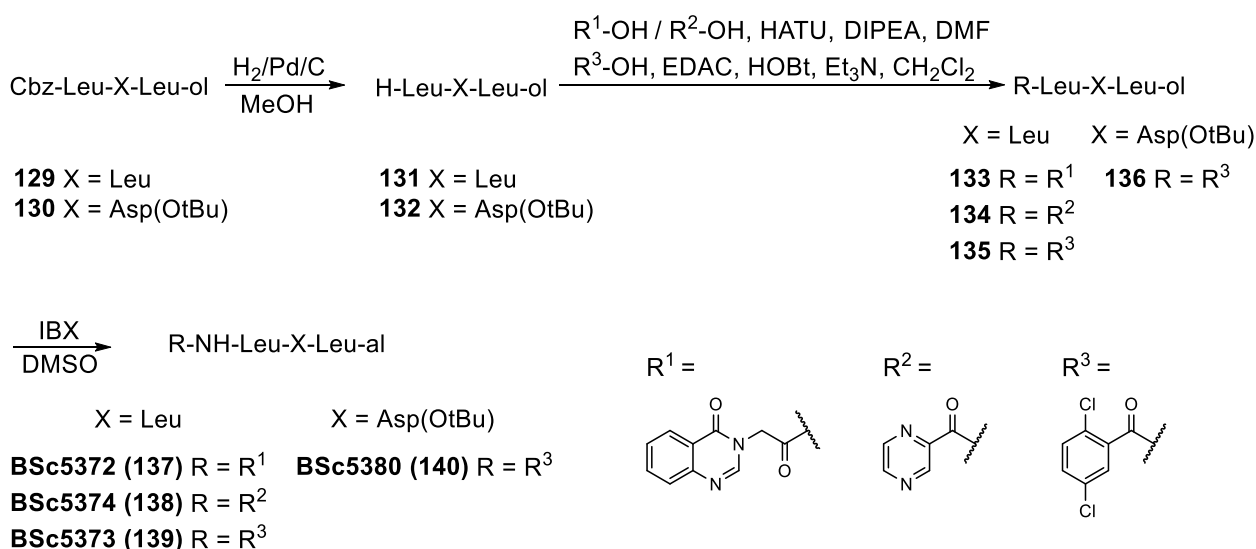


Abbildung 27: **BSc4999**, modifiziert mit R<sup>1</sup> (violett), R<sup>2</sup> (grün) und R<sup>3</sup> (blau).

Aus der Analyse der Strukturen wird deutlich, dass alle drei neuen Reste, wie auch die Cbz-Schutzgruppe, in die P4-Tasche nahe der  $\beta 6$ -Untereinheit passen, ohne Konflikte mit der Proteinoberfläche zu generieren. Zusätzlich können Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Amid-NH der P4-Gruppe und der Asp126 Seitenkette der  $\beta 6$ -Untereinheit ausgebildet werden. Des Weiteren kann  $R^1$  eine  $\pi$ -H-Interaktion mit Pro127 der  $\beta 6$ -Untereinheit eingehen und  $R^2$  zeigt zwei  $\pi$ -H-Interaktionen mit der Val128-Seitenkette, ebenfalls von  $\beta 6$ .

Für die Synthese der modifizierten Inhibitoren wurden zunächst die entsprechend veränderten Aldehyde **137** – **140** als Zielmoleküle gewählt, um diese biochemisch zu evaluieren und eine Vorauswahl für die endgültigen Hybridmoleküle treffen zu können. Die Synthese der Aldehyde ist im folgenden Schema dargestellt.



**Schema 11:** Synthese der *N*-terminal modifizierten Peptidaldehyde **137** – **140**.

Die Synthese der modifizierten Peptidaldehyde **137** – **140** startete mit den Vorstufen der bekannten Inhibitoren **MG132 (2)** und **BSc2118 (3)**, jeweils auf der Stufe der Peptidalkohole **129** und **130**. Zunächst wurde mittels katalytischer Hydrierung die vorhandene Cbz-Schutzgruppe entfernt. Hierfür wurden **129** und **130** mit 10% Palladium auf Aktivkohle in Methanol unter Wasserstoffatmosphäre umgesetzt. Anschließend wurden die neuen Reste  $R^1$  bis  $R^3$  eingeführt. Da es sich hierbei um Carbonsäuren handelt konnten diese mittels klassischer Peptidchemie verbunden werden. Hierfür wurde entweder die Kombination der Kupplungsreagenzien EDAC mit HOBT und Triethylamin als Base in Dichlormethan (für  $R^3$ ) oder das Kupplungsreagenz HATU mit DIPEA als Base in DMF (für  $R^1$  und  $R^2$ ) verwendet. Die erhaltenen Peptidalkohole **133** – **136** konnten anschließend durch die hypervalente Iodverbindung IBX zu den Peptidaldehyden **137** – **140** oxidiert werden. Diese stellen zum einen die Zielmoleküle mit bereits potenzieller inhibitorischer Aktivität dar, können aber auch in der bereits beschriebenen *Passerini*-Reaktion zu den entsprechenden P4-substituierten  $\alpha$ -Ketoamiden umgesetzt werden. Die synthetisierten Aldehyde **137** – **140** wurden anschließend biochemisch auf ihre inhibitorische Aktivität getestet, um eine Vorauswahl der P4-Reste zu ermöglichen. Dies wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.



### 3.1.2.9. Synthese der Hybridstrukturen 142 – 145

Abschließend wurden die Ergebnisse der Struktur-Aktivitätsbeziehungen, die bei der Exploration von P1', P2 und P4 gewonnen werden konnten kombiniert, um mit der Synthese von Hybridmolekülen die zytotoxische Aktivität der  $\alpha$ -Ketoamid-basierten Proteasom-inhibitoren weiter zu steigern. Die besten, jeweiligen Modifikationen sind in Abbildung 28 nochmals zusammengefasst.

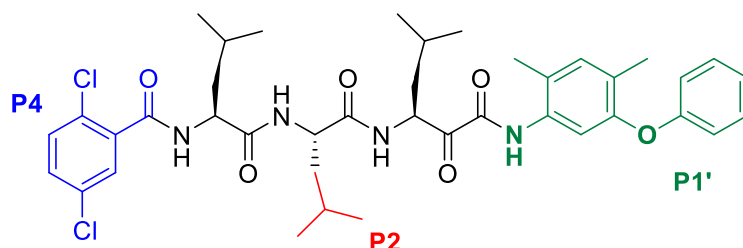
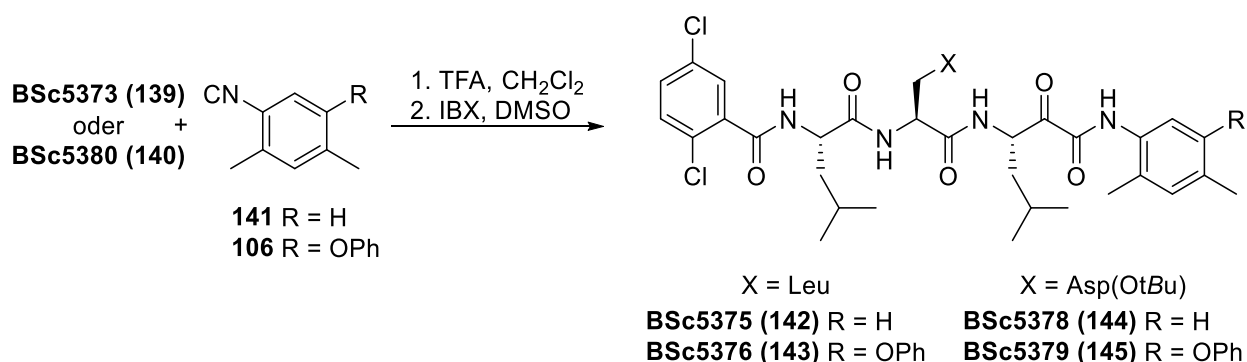


Abbildung 28: Ergebnisse der Struktur-Aktivitätsbeziehungen für P1', P2 und P4.

Die Synthese der Hybridstrukturen 142 – 145 ist im folgenden Schema 11 dargestellt. Neben der Zielstruktur, die sämtliche evaluierte Strukturmodule vereint, wurden zum Beweis der Hypothese noch die entsprechenden Referenzsubstanzen mit Asp(OtBu) in P2 sowie dem Dimethylphenyl-Substituenten von BSc4999 (12) in P1' synthetisiert.



Schema 12: Synthese der Hybridstrukturen 142 – 145.

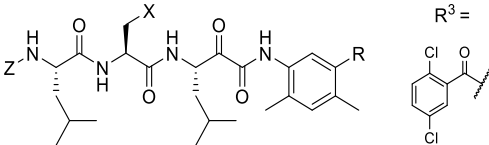


Zur Synthese der Hybridstrukturen wurden die bereits in Abschnitt 3.1.2.7. dargestellten Aldehyde BSc5373 (139) und BSc5380 (140) mit den entsprechenden Isonitrilen 141 und 106 erneut zunächst in einer *Passerini*-Reaktion zu den entsprechenden  $\alpha$ -Hydroxyamiden umgesetzt und anschließend mit der hypervalenten Iodverbindung IBX zu den  $\alpha$ -Ketoamiden 142 – 145 oxidiert.

Hierbei zeigt sich abermals die besondere Eignung der *Passerini*-Reaktion für kombinatorische Synthesen, indem mit Hilfe dieser Reaktion modular und relativ schnell die gewünschten unterschiedlichen Zielstrukturen erhalten werden können.

Im Anschluss an die Synthese wurden die modifizierten Inhibitoren auf ihre Zytotoxizität und ihre Inhibition am isolierten Enzym untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

### 3.1.2.10. Pharmakologische Evaluierung der Hybridstrukturen 142 – 145

Tabelle 4: Übersicht der ermittelten Inhibitionswerte der Hybridstrukturen 142 – 145.

<div style="text-align: center;">  </div>										
Substanz	X	Z	R	IC <sub>50</sub> MV4-11 / nM	Relative Inhibition / %					
					c = 100 nM		c = 1 μM			
					β5c	β5i	β5c	β5i	β2c	β1c
Btz (4)	-	-	-	34 ± 5	89	85	98	98	5	80
Cfz (8)	-	-	-	3.6 ± 1.8	86	43	96	91	37	-18
BSc4999 (12)		Cbz	H	19 ± 3	64	33	92	74	9	-26
BSc5322 (72)		Cbz	OPh	18 ± 3	56	23	81	31	9	0
BSc5375 (142)		R <sup>3</sup>	H	25 ± 5	25	4	51	24	17	-38
BSc5376 (143)		R <sup>3</sup>	OPh	7.4 ± 2.6	83	58	91	68	6	-48
BSc5378 (144)		R <sup>3</sup>	H	47 ± 5	26	35	81	52	6	-10
BSc5379 (145)		R <sup>3</sup>	OPh	58 ± 10	26	8	53	-1	-4	-19

Die Auswertung der ermittelten Werte zeigt, in Übereinstimmung mit den entsprechenden Struktur-Aktivitätsbeziehungen, die im Vorfeld ermittelt werden konnten, dass das 3-Phenoxy-4,6-dimethylphenyl-Derivat **BSc5376 (143)** die potenteste Verbindung des gesamten Projekts ist. Dies bestätigt sich sowohl bei der Ermittlung der Zytotoxizität in in MV4-11-Zellen (IC<sub>50</sub> = 7.4 ± 2.6 nM) sowie bei der relativen Inhibition des isolierten Proteasoms (β5c = 83% und 91% bzw. β5i = 58% und 68%, jeweils bei 100 nM und 1 μM Inhibitor). Die Inhibition von β5i ist hierbei mit der von **BSc5373 (139)** vergleichbar. Da sich das vorliegende Projekt hauptsächlich mit der Inhibition des konstitutiven Proteasoms beschäftigt und eine duale Inhibition von β5c und β5i ebenfalls durch die in der Klinik verwendeten Substanzen beobachtet wird, stellt die Inhibition des Immunoproteasoms keinen problematischen Effekt dar. Eine Beschränkung auf die Inhibition des Immunoproteasoms wird im folgenden Projekt in Abschnitt 3.2. verfolgt. Die Kombination der 2,4-Dimethylphenylamid-Gruppe von **BSc4999 (12)** mit R<sup>3</sup> am N-Terminus in P4 (**BSc5375 (142)**, IC<sub>50</sub> = 25 ± 5 nM) erweist sich als nicht vorteilhaft im Vergleich mit **BSc4999 (12)**. Auch die relative Inhibition des isolierten Proteasoms ist deutlich geringer. Wie auch schon bei den vorherigen Substanzen zeigt die Substitution von Leu in P2 durch Asp(OtBu) eine geringere zytotoxische Aktivität. Dies wird sowohl bei der Adressierung von S1' mit der 3-Phenoxy-4,6-dimethylphenyl-Substitution (**BSc5379 (145)**, IC<sub>50</sub> = 58 ± 10 nM), als auch mit der 2,4-Dimethylphenyl-Substitution (**BSc5378 (144)**, IC<sub>50</sub> = 47 ± 5 nM) deutlich. Interessanterweise kehrt sich bei den Asp(OtBu)-Derivaten der Trend der Inhibitionsstärke im Vergleich mit den Leu-Derivaten um, sodass die 2,4-Dimethylphenyl-Substitution die aktivere Substanz liefert. Bei sämtlichen neusynthetisierten Derivaten konnte außerdem erneut keine nennenswerte Inhibition der β2c und β1c Untereinheiten beobachtet werden.

Die zytotoxische Aktivität der Leitstruktur **BSc5376 (143)** in MV4-11-Zellen im Vergleich mit klinisch zugelassenen Wirkstoffen, ist hierbei ähnlich stark wie die Aktivität von **Carfilzomib (8)** ( $IC_{50} = 3.6 \pm 1.8$  nM), und deutlich stärker als die zytotoxische Aktivität von **Bortezomib (4)** ( $IC_{50} = 34 \pm 5$  nM). Besonders bemerkenswert ist hierbei jedoch die Tatsache, dass es sich bei **BSc5376 (143)** um einen kovalent-reversiblen Inhibitor handelt im Gegensatz zu den (pseudo)-irreversibel bindenden Substanzen **Carfilzomib (8)** und **Bortezomib (4)**.

Um ein tieferes Verständnis der Struktur-Aktivitätsbeziehungen zu erhalten, wurden die Zytotoxizitäten in weiteren Leukämiezelllinien bestimmt, sowie die  $IC_{50}$ -Werte für die Leitstrukturen ermittelt. Hierbei ist der Vergleich zwischen der Ausgangsstruktur **BSc4999 (12)**, dem in P1' verlängerten Inhibitor **BSc5322 (72)** und der Leitstruktur **BSc5376 (143)** entscheidend. Diese Verbindungen wurden weiterhin mit dem zugelassenen Inhibitor **Carfilzomib (8)** verglichen. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 5 dargestellt, wobei die Zellviabilitäten erneut in Kooperation mit *Dennis Bensinger* im AK B. Schmidt bestimmt wurden und bereits Gegenstand seiner Dissertation sind.<sup>[120]</sup>

**Tabelle 5:** Vergleich der zytotoxischen Aktivitäten in Leukämiezelllinien und Inhibition von  $\beta 5c$  und  $\beta 5i$ .

Substanz	Zellviabilität $IC_{50}$ / nM			$IC_{50}$ / nM		$IC_{50}$ $\beta 5i/\beta 5c$
	MV4-11	THP-1	Jurkat	$\beta 5c$	$\beta 5i$	
<b>Cfz (8)</b>	$3.6 \pm 1.8$	$135 \pm 39$	$14 \pm 3$	8	142	17.8
<b>BSc5376 (143)</b>	$7.4 \pm 2.6$	$66 \pm 1$	$11 \pm 1$	23	96	4.2
<b>BSc5322 (72)</b>	$18 \pm 3$	$30 \pm 10$	$24 \pm 4$	66	170	2.6
<b>BSc4999 (12)</b>	$19 \pm 3$	$24 \pm 0.1$	$30 \pm 0.3$	48	204	4.3

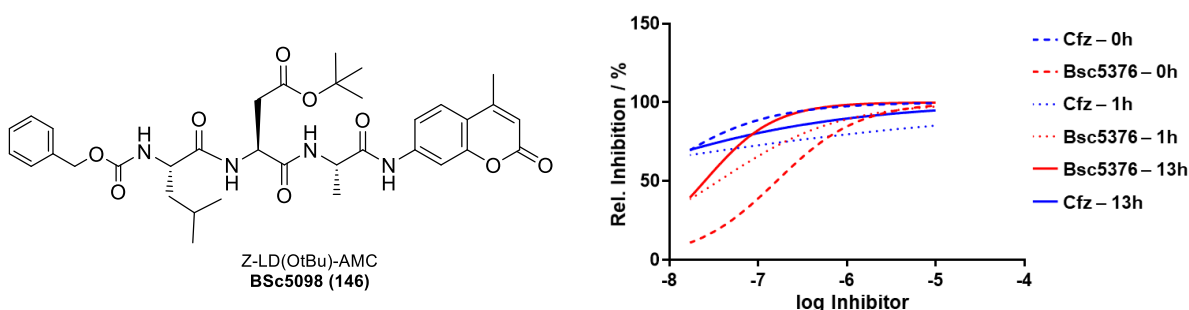
Bei der Betrachtung der  $IC_{50}$ -Werte lässt sich der zuvor ermittelte Trend der Substanzen erneut feststellen. **BSc5376 (143)** zeigt im Vergleich zu der Ausgangssubstanz **BSc4999 (12)** und der ersten P1' verlängerten Variante **BSc5322 (72)** die höchste  $\beta 5c$ -Inhibition und bewegt sich nun in der Region von **Carfilzomib (8)**. Die Inhibition von  $\beta 5i$  durch **BSc5376 (143)** ist ebenfalls die höchste der Serie, wobei das Selektivitäts-Verhältnis der Inhibition von  $\beta 5i/\beta 5c$  dem von **BSc4999 (12)** entspricht und ebenfalls deutlich gesteigert zu **BSc5322 (72)** ist.

Vergleicht man die Zellviabilitäten, so zeigt **Carfilzomib (8)** eine stärkere zytotoxische Aktivität gegen MV4-11-Zellen als die Ketoamide. Dies korreliert mit der Inhibition des isolierten Proteasoms, ist aber wegen des zugrundeliegenden irreversiblen Bindungsmodus sowie des optimierten Tetrapeptid-Rückgrats, an Stelle der synthetisch leichter zugänglichen Leucin-Reste, zu erwarten. Betrachtet man die zytotoxischen Aktivitäten in Jurkat-Zellen, so zeigt sich eine ähnliche Aktivität von **BSc5322 (72)** und **BSc4999 (12)**. **BSc5376 (143)** zeigt über alle Substanzen die höchste Aktivität, sogar höher als bei **Carfilzomib (8)**. Hierbei könnte es sich um eine Folge von erhöhtem Proteasom-Umsatz oder ein unterschiedliches Expressionsverhältnis von Immunoproteasom zu konstitutivem Proteasom handeln. Auch eine Desaktivierung von **Carfilzomib (8)** durch beispielsweise ein erhöhtes GSH-Level, wobei das Cystein-Schwefelatom der GSH-Seitenkette und nicht Thr10y als Nukleophil fungiert und mit dem Epoxyketon reagiert, ist denkbar. Bei der Betrachtung der Zellviabilitäten der THP-1-Zellen fällt auf, dass **Carfilzomib (8)** hierbei mit Abstand die geringste Aktivität zeigt. Dies ist vermutlich auf eine deutliche Überexpression des Immunoproteasoms in dieser Zelllinie zurückzuführen.<sup>[129]</sup> Innerhalb der BSc-Reihe zeigt **BSc4999 (12)** die stärkste Aktivität gefolgt von **BSc5322 (72)**



und **BSc5376 (143)**. Dieser Trend könnte durch eine verbesserte Zellpermeabilität von **BSc4999 (12)** im Verhältnis zu den größeren Derivaten hervorgerufen werden.

2016 wurde in der Arbeitsgruppe *B. Schmidt* ein  $\beta$ 5-Untereinheits-spezifisches, fluorogenes Proteasom-Substrat entwickelt, das eine Asp(OtBu)-Seitenkette in P2 trägt (Z-LD(OtBu)A-AMC, **BSc5098 (146)**, Abbildung 29). Hierbei wurde festgestellt, dass eine gesteigerte Selektivität und katalytische Effizienz von kleinen Resten in P1, wie beispielsweise Alanin, profitiert, während die Stärke der Inhibition den gegenteiligen Trend aufweist und größere Reste in P1 favorisiert.<sup>[27]</sup> Das entwickelte Substrat wurde durch weitere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für die Entwicklung eines Assays verwendet, mit dem die intrazelluläre Inhibition des Proteasoms durch verschiedene Inhibitoren in lebenden Zellen bestimmt werden kann.<sup>[120]</sup> Für die Etablierung des Assays wurden die vorliegenden Substanzen **BSc4999 (12)**, **BSc5322 (72)** und **BSc5376 (143)** sowie **Carfilzomib (8)** als Referenz verwendet. Es wurden verschiedene Vorinkubationszeiten (0 h – 13 h) vor Zugabe des Substrats und der Detektion in diversen Leukämiezelllinien untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.<sup>[120]</sup>



#### Inhibition der zellulären Umsetzung von BSc5098

Substanz	IC <sub>50</sub> MV4-11			IC <sub>50</sub> Jurkat			IC <sub>50</sub> THP-1		
	0 h	1 h	13 h	0 h	1 h	13 h	0 h	1 h	13 h
<b>BSc4999</b>	137	38	92	176	107	107	304	121	215
<b>BSc5322</b>	631	43	22	1.200	70	16	1000	67	44
<b>BSc5376</b>	162	12	8	214	20	10	228	84	84
<b>Cfz</b>	5	1	1	15	1	1	36	53	98

**Abbildung 29:** Struktur des verwendeten Substrats **BSc5098** (links). Zeitabhängigkeit der intrazellulären Proteasom-Inhibition (rechts) und Zeitabhängige IC<sub>50</sub>-Werte der intrazellulären Proteasom-Inhibition (unten).

**Carfilzomib (8)** führt in MV4-11-Zellen zu einer schnellen, nahezu kompletten Inhibition der Substrat-Konversion, selbst bei der gleichzeitigen Zugabe von Substrat und Inhibitor sowie lediglich 30 min Vorinkubation vor dem Start der Fluoreszenzmessung. Die Inhibition steigt mit einer Vorinkubation von 1 h vor Substrat-Zugabe noch einmal etwas an und behält diesen Wert auch bei 13 h Vorinkubation bei. Entgegen der raschen Inhibition des irreversiblen Inhibitors **Carfilzomib (8)** setzt die Inhibition durch die kovalent-reversiblen Ketoamide deutlich langsamer ein. Im Vergleich mit **BSc5322 (72)** zeigt **BSc5376 (143)** eine deutlich stärkere Inhibition zu allen Zeitpunkten, wobei die Inhibitionsstärke mit steigender prä-Inkubationszeit bei beiden Inhibitoren zunimmt. Bei einer Vorinkubationszeit von 13 h korreliert die beobachtete Inhibition mit den entsprechenden zytotoxischen Werten (**BSc5376 (143)** IC<sub>50</sub> = 8 nM; **BSc5322 (72)** IC<sub>50</sub> = 22 nM). Die langsamere Zunahme der inhibitorischen Aktivität von **BSc5322 (72)** lässt sich entweder durch eine geringere Zellpermeabilität oder eine verminderte

---

Assoziationsrate an das aktive Zentrum begründen, da im Gegensatz zu **BSc4999 (12)** zusätzlich S1' weiter adressiert wird. Die bei **BSc4999 (12)** beobachtete Abnahme der Inhibition, nach anfänglicher Zunahme, liegt vermutlich an einer schnelleren Dissoziation vom aktiven Zentrum, da wiederum keine Wechselwirkungen mit der S1'-Tasche des Substratbindekanals ausgebildet werden. Ein ähnlicher Trend wird für die Inhibition des Proteasoms durch **BSc4999 (12)** auch in Jurkat- und THP-1-Zellen beobachtet.

In Jurkat-Zellen ist die Inhibition durch **Carfilzomib (8)**, über sämtliche Inkubationszeiten hinweg, erneut am stärksten. Die Ketoamide zeigen einen langsameren Beginn der Inhibition, deren Werten nach 13 h Inkubation denen in MV4-11-Zellen ähneln, wobei **BSc4999 (12)** erneut die geringsten Inhibitionswerte aufweist. Vergleicht man die ermittelten Werte der intrazellulären Proteasom-Inhibition mit denen der Zytotoxizität, so fällt auf, dass die Zytotoxizität von **BSc4999 (12)** und **BSc5322 (72)** mit der relativen Proteasom-Inhibition korreliert. **Carfilzomib (8)** zeigt trotz der ausgeprägteren zellulären Inhibition des Proteasoms eine etwas geringere zytotoxische Aktivität im Vergleich mit **BSc5376 (143)**.

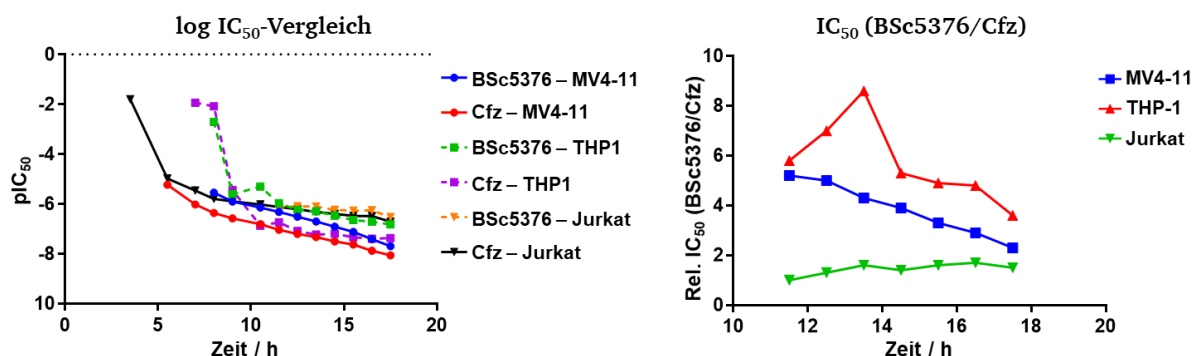
Interessanterweise stellt sich dieser Sachverhalt in THP-1-Zellen deutlich anders dar. Nach kurzen Inkubationszeiten zeigt **Carfilzomib (8)** noch die stärkste inhibitorische Aktivität, während diese mit zunehmender Inkubationszeit abnimmt und nach 13 h Inkubationszeit sogar geringer ist als die inhibitorische Aktivität von **BSc5322 (72)** und **BSc5376 (143)**. Für diese beiden Ketoamide ist ein Anstieg der Inhibition mit steigender Inkubationszeit zu beobachten, wobei im Gegensatz zu den Werten in MV4-11- und Jurkat-Zellen, **BSc5322 (72)** nach 13 h eine stärkere Wirkung als **BSc5376 (143)** zeigt. **BSc4999 (12)** besitzt auch hier die niedrigste Aktivität der Serie und zeigt erneut das Verhalten wie in MV4-11-Zellen, mit einer anfänglichen Steigerung der Inhibition, gefolgt von einer Abnahme nach 13h Inkubationszeit. Im direkten Vergleich mit den ermittelten Werten für die jeweilige zytotoxische Wirkung, ist der zu beobachtende Trend vergleichbar.

Mögliche Gründe für das beobachtete Verhalten in der THP-1-Zelllinie können eine erhöhte Expression des iCP sein, da dieses deutlich schwächer von **Carfilzomib (8)** inhibiert wird als das cCP. Auch die Ausbildung von Resistenzmechanismen ist denkbar, bei denen sich die Zusammensetzung des Proteasoms verändert, vermehrt die  $\beta 5i$ -Untereinheit eingebaut wird und somit nach der initialen Wirkung von **Carfilzomib (8)** und **BSc5376 (143)** eine partielle Resistenz entsteht.<sup>[129-130]</sup> Die Veränderung der Zusammensetzung des Kernpartikels kann hierbei beispielsweise durch eine vermehrte Expression von TNF- $\alpha$  oder INF $\gamma$  induziert werden, wie bereits in der Einleitung beschrieben.

Zur näheren Analyse des zeitabhängigen Verlaufs der zytotoxischen Wirkung wurde die Zellviabilität in MV4-11-, Jurkat- und THP-1-Zellen mit dem chemolumineszenten *RealTime-Glo* Assay (Promega) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Inkubation mit **Carfilzomib (8)** und **BSc5376 (143)** kontinuierlich über 18 h bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

Im Einklang mit den ermittelten Werten für die zytotoxische Aktivität nach 72 h Inkubationszeit der diversen Zelllinien sowie der zellulären Proteasom-Inhibition, zeigt **Carfilzomib (8)** eine stärkere zytotoxische Aktivität in MV4-11-Zellen und eine vergleichbare Aktivität in Jurkat-Zellen, allerdings mit einem schnelleren Einsetzen der Zytotoxizität (siehe Tabelle 5). In THP-1-Zellen zeigt **Carfilzomib (8)** einen deutlich stärkeren Anstieg der Zytotoxizität im Vergleich zu **BSc5376 (143)**, mit einer maximalen 9-fachen Stärke bei 14 h Inkubationszeit, jedoch gleichen sich die Werte zum Ende des Assays hin an. Da die ermittelten Werte der Endpunkt-Zytotoxizitäten bei 72 h eine stärkere Aktivität von **BSc5376 (143)** im Vergleich zu **Carfilzomib**

aufweisen, ist davon auszugehen, dass sich der beobachtete Trend fortsetzt und **BSc5376 (143)** im Laufe der Zeit eine stärkere zytotoxische Aktivität als Carfilzomib entwickelt. Am Verlauf der Kurven lässt sich gut der jeweilige Bindungsmodus erkennen. Der irreversible Inhibitor **Carfilzomib (8)** setzt mit einer frühen starken Wirkung ein, während der kovalent-reversible Inhibitor **BSc5376 (143)** langsamer an das aktive Zentrum assoziiert, mit der Zeit aber seine Inhibition deutlich steigert.

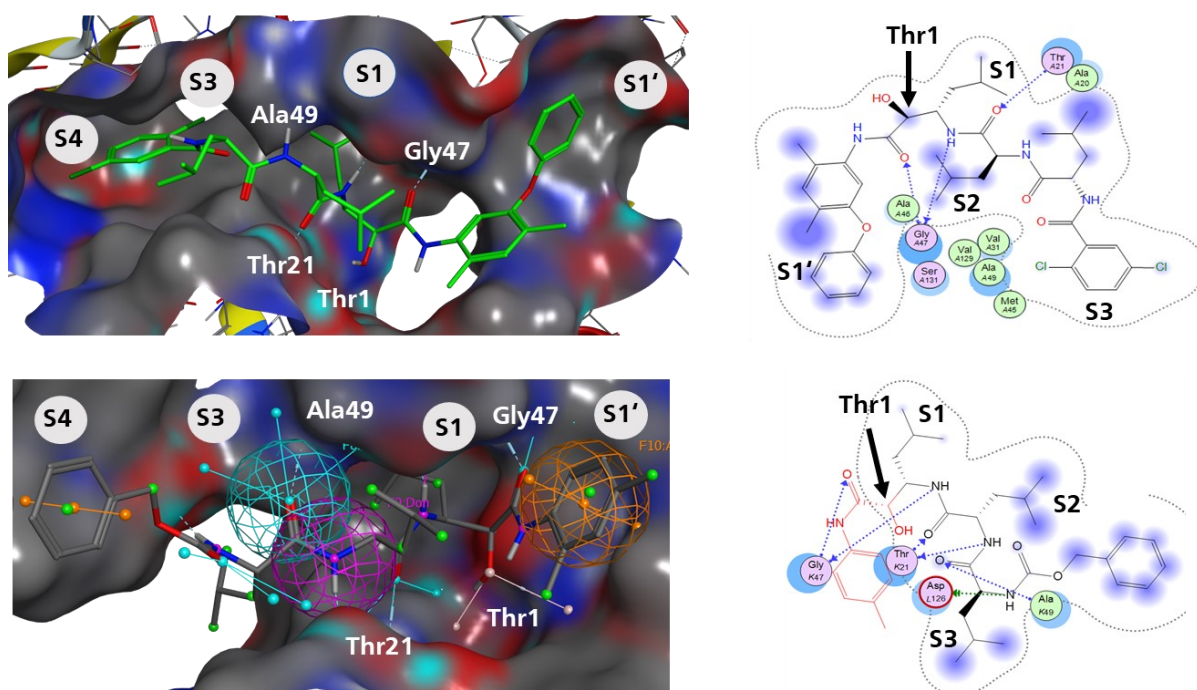


**Abbildung 30:** Vergleich der zeitabhängigen Zytotoxizität von **Carfilzomib (8)** und **BSc5376 (143)** in verschiedenen Leukämiezelllinien (links) und Relative Inhibition ( $IC_{50}(BSc5376)/IC_{50}(Carfilzomib)$ ) in Abhängigkeit der Inkubationsdauer (rechts).

Betrachtet man die ermittelten Werte genauer, so wird ersichtlich, dass nach ca. 13 h die Zytotoxizität hoch genug ist, dass ab diesem Zeitpunkt der Zelltod auch im zellulären Proteasom-Inhibitions-Assay relevant wird. Dieser Effekt kann möglicherweise die ermittelten Werte beeinflussen, da es beispielsweise zu einer gesteigerten Proteolyse im Medium kommen kann oder zu einem gesteigerten Substrat-Einstrom in die Zellen durch gestörte Zellmembranen.

Da die *meta*-Phenoxy-dichlorbenzamid-substituierte Leitstruktur **BSc5376 (143)** einen etwas überraschenden Vorteil gegenüber **BSc5322 (72)** und **BSc4999 (12)** zeigt, der sich nicht anhand der ursprünglichen molekularen Modellierung erklären lässt, sollte dies noch näher untersucht werden. Hierfür wurde in Kooperation mit Prof. Groll von der Technischen Universität München versucht, eine Kokristallstruktur von **BSc5376 (143)** im Komplex mit dem yCP aufzunehmen. Die Kristallisationsversuche schlugen allerdings fehl, weshalb im Rahmen der Dissertation von *Dennis Bensinger* eine neuartige *de novo* Strategie für das *Docking* von kovalent-reversiblen Proteasominhibitoren unter Zuhilfenahme der MOE-Erweiterung *DOCKTITE*<sup>[131]</sup> entwickelt wurde.<sup>[120]</sup> Hiermit sollte die deutlich gesteigerte zelluläre Aktivität und Proteasom-Inhibition erklärt werden und gleichzeitig eine strukturbasierte Hypothesenentwicklung zur Konstruktion neuer potenter Inhibitoren, für eine Besetzung der S'-Richtung des  $\beta 5c$ -Bindeganals, ermöglicht werden.

Ein reines *de novo Docking* von peptidischen Proteasominhibitoren ist in der Literatur nicht beschrieben und äußerst anspruchsvoll, da vor allem die Flexibilität und Größe der Peptide, im Gegensatz zu beispielsweise heteroaromatischen Liganden, deutlich erhöht ist. Ein Großteil der Bindetaschen des Proteasoms sind, bedingt durch die Proteasomarchitektur, Solvens-exponiert, wodurch in Kombination mit der hohen Anzahl an frei drehbaren Bindungen der Peptide viele potenzielle *Docking*-Positionen außerhalb der S1 – S4 Bindetaschen ermöglicht werden. Außerdem ist bisher noch kein *Docking*-Ansatz für die Adressierung der S1'-Bindetasche erprobt bzw. entwickelt worden. Die bestbewertete *Docking*-Struktur ist an Abbildung 31 dargestellt.



**Abbildung 31:** Bindungskonformation der am besten bewerteten Struktur von **BSc5376 (143)** in die  $\beta$ -5-Untereinheit mit der entsprechenden Ligandeninteraktionskarte (oben) sowie das verwendete Pharmakophormodell, basierend auf **BSc4999 (12)** sowie die entsprechende Ligandeninteraktionskarte (unten).

Mit der entwickelten Methode wurde ein *de novo Docking* der Leitstruktur **BSc5376 (143)** in die  $\beta$ 5-Untereinheit durchgeführt. Hierfür wurde ein Pharmakophormodell basierend auf **BSc4999 (12)** und einer sich anschließenden stochastischen Stichprobe möglicher, lokal energieminimierter Konformationen verwendet, um die entsprechenden freien Konformationen von **BSc5376 (143)** zu erhalten. Es folgten Markierung und Verknüpfung mit der Thr1-Seitenkette wodurch die Startkonformationen für das kovalente *Docking* erhalten wurden. Die erhaltenen Positionen von **BSc5376 (143)** in der  $\beta$ 5-Untereinheit wurden von der Seitenkette getrennt und mit der DSX-Methode neu bewertet.<sup>[120]</sup>

Die hierbei am besten bewertete Position zeigt im konservierten Molekülteil eine sehr ähnliche Konformation wie **BSc4999 (12)**. Betrachtet man allerdings die Variationen in P4 sowie P1', so sind wichtige Unterschiede erkennbar. Die Phenylether-Gruppe ist im Gegensatz zur ursprünglichen Modellierung komplett in der S1'-Tasche platziert, während die Phenylamid-Gruppe noch im Substratbindekanal liegt, ähnlich zur Struktur von **BSc4999 (12)** und unabhängig der Orientierung in P3 und P4. Entgegen der ursprünglichen Annahme zum Einfluss des Austauschs der *N*-terminalen Cbz-Schutzgruppe in P4, zeigt im vorliegenden *Docking*-Modell die Dichlor-benzamid-Substitution keine Interaktion mit  $\beta$ 6 in P4 auf. Nach dem vorliegenden Modell kommt es zu einer Drehung um die Amid-Bindung und somit zu einer Besetzung der S3-Tasche der  $\beta$ 5-Untereinheit. Dadurch wird die Leucin Seitenkette in P3 in Richtung der S4-Tasche positioniert. Die Belegung von S3 mit der im Vergleich zu Leucin deutlich größeren Dichlorphenyl-Gruppe kann sowohl enthalpische sowie entropische Vorteile liefern. Betrachtet man die Kokristallstruktur von **BSc4999 (12)**, so fällt auf, dass die S3-Tasche nur unvollständig durch die Leucin-Seitenkette ausgefüllt wird. Dadurch befinden sich noch drei weitere Wassermoleküle mit in der Tasche, die durch die Dichlorbenzamid-Gruppe verdrängt werden, wodurch ein entropischer Vorteil erzielt wird. Durch unspezifische, hydrophobe Wechselwirkungen kann des Weiteren ein enthalpischer Vorteil entstehen, der

---

durch die kleinere Leucin-Seitenkette nicht möglich ist. In der Kokristallstruktur von **BSc4999 (12)** ist außerdem eine bevorzugte Addition von Thr1O $\gamma$  in der *R*-Konfiguration zu beobachten. Auch dieses Verhalten kann im *Docking* ebenfalls beobachtet werden. Auch die Besetzung des Oxyanion-Lochs im aktiven Zentrum wird durch das erhaltene *Docking*-Modell korrekt wiedergegeben. Bei der Addition von Peptidaldehyden kommt es hierbei zu einer Belegung durch die Halbacetal-Hydroxylgruppe, während nach Addition an  $\alpha$ -Ketoamide nicht die Hydroxylgruppe, sondern die Carbonylgruppe des Phenylamids das Oxyanion-Loch besetzt. Ein endgültiger Beweis der genauen Struktur von **BSc5376 (143)** im gebundenen Zustand an die  $\beta$ 5-Untereinheit des Proteasoms kann jedoch nur durch experimentelle Methoden, wie die Kokristallisation oder die Analyse der Protein-Liganden-Interaktion mittels NMR-Spektroskopie erhalten werden.

### 3.1.3. Evaluierung von BSc5376 in *Danio rerio* Embryonen

Die Verwendung von *in vivo*-Assays an *Danio rerio* Embryonen ermöglicht die Verfolgung gewünschter bzw. unerwünschter Effekte von potenziellen Wirkstoffen, direkt nach der Synthese, am lebenden Organismus. So kann beispielsweise die toxikologisch unbedenkliche Wirkstoffkonzentrations-Obergrenze durch das sogenannte *Danio rerio* Toxizitätsassay (DarT-Assay) ermittelt werden. Hierbei wird die Entwicklung der Zebrafischlarven in unterschiedlich konzentrierten, wässrigen Wirkstofflösungen verfolgt. Somit wird eine Abschätzung der toxikologischen Kennzahl LC<sub>50</sub> oder des biologischen Wirkkriteriums EC<sub>50</sub> möglich. Zudem wurden auch durchaus spezielle Assays, wie etwa das Fluchtreflex-Assay oder die Verfolgung der Verteilung von Fluoreszenz-Farbstoffen im Organismus entwickelt.

Zur weitergehenden Untersuchung der Leitstruktur **BSc5376 (143)** sollte diese im DarT-Assay auf ihre Sicherheit untersucht werden. Für eine erste Abschätzung der neurotoxischen Eigenschaften sollte die Leitstruktur weiterhin in einem *Danio rerio* Embryo Fluchtreflex-Assay mit dem klinisch verwendeten Proteasom-Inhibitor **Bortezomib (4)** verglichen werden.

#### 3.1.3.1. Evaluierung von BSc5376 im *Danio rerio* Toxizitätsassay

Die Untersuchung der synthetisierten Leitstruktur **BSc5376 (143)** im Vergleich mit **Bortezomib (4)**, **Carfilzomib (8)**, **BSc4999 (12)** und **BSc5322 (72)** auf Biokompatibilität und toxikologische Effekte in *Danio rerio* Embryonen, soll erste Anhaltspunkte über die Toxizität liefern. Der Zebrafischembryo ist als Modellorganismus in der präklinischen Evaluierung von Wirkstoffen etabliert und erlaubt die erste Einschätzung der Toxizität in Embryonen bis 5 Tage nach der Befruchtung. Neben zielspezifischen Wirkungen erlaubt das Tiermodell auch die toxikologische Evaluierung der Inhibition von nicht-Ziel Proteinen und die Wirkung von Metaboliten. Tabelle 6 zeigt die erhaltenen Werte des DarT-Assays.

**Tabelle 6:** Toxizität in *Danio rerio* Embryonen (nicht dechorioniert) der wichtigsten Substanzen (n = Anzahl der Embryonen und Überleben in %).

Substanz	Konz. / $\mu\text{M}$	0 h		24 h		48 h		72 h		96 h	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Bortezomib (4)</b>	1	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	5	5	100	5	100	5	100	5	100	4	80
	10	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	25	5	100	5	100	5	100	5	100	4	80
<b>Carfilzomib (8)</b>	1	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	5	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	10	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	25	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
<b>BSc4999 (12)</b>	1	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	5	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	10	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	25	5	100	4	80	4	80	4	80	4	80
<b>BSc5322 (72)</b>	1	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	5	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	10	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	25	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
<b>BSc5376 (143)</b>	1	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	5	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	10	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
	25	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100
<b>Kontrolle</b>	-	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100

Bei der Betrachtung der ermittelten Werte wird ersichtlich, dass es bei keiner der Untersuchten Substanzen zu einem nennenswerten Effekt kommt. Dem Verenden der Embryonen unter Einwirkung von **Bortezomib (4)** (5 und 25  $\mu\text{M}$ , 96 h) und **BSc4999 (12)** (25  $\mu\text{M}$ , 24 h) liegen vermutlich statistische Artefakte zu Grunde. Es kann somit bei allen getesteten Substanzen von einer im ersten Test hohen toxikologischen Sicherheit ausgegangen werden.

### 3.1.3.2. Evaluierung von BSc5376 im *Danio rerio* Embryo Fluchtreflex-Assay

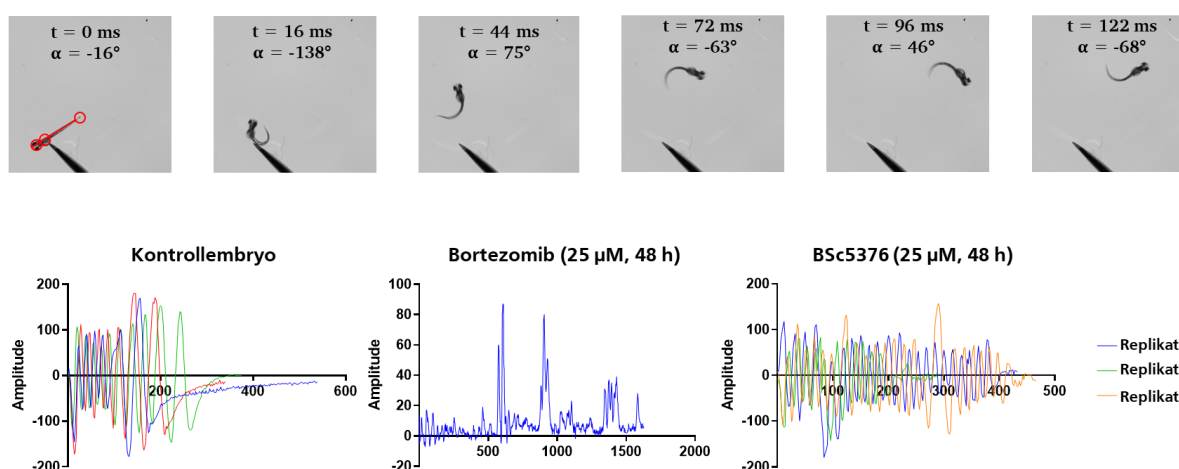
Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kommt es bei der Behandlung mit dem klinisch verwendeten Proteasom-Inhibitor **Bortezomib (4)** häufig zur Ausbildung einer peripheren Neuropathie. Hierbei handelt es sich um eine neurotoxische Nebenwirkung der Pharmaka die Dosis-limitierend ist, auch durch andere Chemotherapeutika hervorgerufen werden kann und eine wesentliche Schwachstelle der Therapie darstellt. Neue Inhibitoren sollen folglich ohne diese Nebenwirkung auskommen. Ein effizientes, präklinisches Assay, das eine erste Einschätzung neuer Substanzen auf ihre Neurotoxizität erlaubt ist deshalb von großem Interesse. Im Rahmen der Dissertation von C. Voss im AK B. Schmidt wurde hierfür ein Assay entwickelt, dass auf dem Fluchtreflex von Zebrafisch-Embryonen basiert.<sup>[132]</sup> Diese Ergebnisse wurden als Startpunkt verwendet, um das Assay zu optimieren und die in dieser Arbeit entwickelten Substanzen zu evaluieren. Der Fluchtreflex der Zebrafischlarven, der bereits im Embryonalstadium ausgeprägt ist, kann hierbei als Maßstab für die Neurotoxizität genutzt werden. Hierbei wird die Reaktion des Embryos nach einem äußeren Reiz mittels einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet und die Änderung des Winkels der Körperbiegung mit einer speziellen Software zeitaufgelöst analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Versuchsaufbau optimiert, der in Abbildung 32 dargestellt ist. Die Aufnahme der Daten erfolgte im Rahmen des Medizinalchemie Praktikums von Studierenden und die statistische Auswertung erfolgte durch weitere Mitglieder der Arbeitsgruppe.<sup>[120]</sup>



**Abbildung 32** Experimenteller Aufbau zur Analyse des Fluchreflexes von *Danio rerio*-Embryonen. Digitale Highspeed Kamera MotionBlitz EoSens mini1; KIPON Nikon C Adapter; 20 mm Extender; Sigma 50 mm F2.8 EX DG Makroobjektiv (55 mm); SL-300 LED Soft Light.



Für die Bestimmung der Änderungen im Verhalten des Fluchtreflexes wurden die Embryonen 24 hpf manuell dechorioniert und bei zwei verschiedenen Konzentrationen (25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M) von **Bortezomib (4)** und **BSc5376 (143)** mit unterschiedlicher Dauer (24 h, 48 h und 72 h) inkubiert. Die Aufnahme der Daten der Fluchtreflexe erfolgte 96 hpf nach der Behandlung an noch lebenden Embryonen. Die Embryonen werden hierfür in einem *deep-well*-Objektträger unter einer *Highspeed*-Kamera auf einer Tellerleuchte platziert (vergleiche Abbildung 32). Der Fluchtreflex wird durch leichtes Berühren mit einer Nadel ausgelöst und die erhaltenen Bilder der Änderung des Winkels der Körperbiegung werden mit einem MatLab-basierten Skript, das von Uwe Schmidt (AK Stefan Roth, FB Informatik, TU Darmstadt) bereitgestellt wurde, ausgewertet. Ein typischer Bewegungsablauf des Fluchtreflexes mit beispielhafter Bestimmung des Winkels der Körperbiegung sowie ein Vergleich der Ergebnisse nach 48 h Inkubationszeit sind in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33.** Beispielhafter Bewegungsablauf des Fluchtreflexes mit Bestimmung des Winkels der Körperbiegung (oben) und Vergleich der Biegungsamplitude nach 48 h Inkubationszeit von **Bortezomib (4)**, **BSc5376 (143)** und einer Kontrolle (unten).

Die Toxizität bei den dechorionierten Embryonen die mit **Bortezomib (4)** behandelt wurden war bei 50  $\mu$ M und 48 h bzw. 72 h Inkubationszeit (0% Überlebensrate) deutlich höher im Vergleich zu **BSc5376 (143)**. Die beobachteten Werte variieren hier etwas zu den ermittelten Werten während des DarT-Assays. Dies ist aber aufgrund des fehlenden Chorions nicht verwunderlich. Sämtliche Embryonen der Kontrollgruppe waren bis zum Ende des Experiments noch lebendig. Die im Experiment verwendeten Embryonen wurden den Richtlinien entsprechend spätestens 120 hpf euthanasiert. Hierbei handelt es sich um den Zeitpunkt, bei dem die Larven noch nicht selbstständig auf Nahrungssuche gehen, weshalb sie per Definition noch nicht als Tiere eingestuft werden. Somit sind die vorliegenden Versuche rechtlich nicht als Tierversuche einzuordnen und dementsprechend nicht genehmigungspflichtig. Für die Analyse der Fluchtreflexe zwischen der Kontrollgruppe, **Bortezomib (4)** und **BSc5376 (143)** wurde die Analyse nur für die Behandlungsgruppen durchgeführt, bei der mindestens zwei Embryonen überlebt haben. Die hier vorgestellten Daten beziehen sich auf eine Wirkstoffkonzentration von 25  $\mu$ M und einer Inkubationszeit von 48 h und werden mit der Kontrollgruppe sowie untereinander verglichen. Ein charakteristischer Fluchtreflex startet mit einer starken Körperbiegung, dem sogenannten *C-Bend*, die vom Ort des Stimulus weggerichtet ist. Diese wird gefolgt von einer starken entgegengerichteten Biegung, die für eine Reorientierung des Embryos sorgt und an die sich die eigentliche Fluchtbewegung anschließt.



---

Betrachtet man die aufgetragenen Amplituden der *C-Bends* der Kontrollgruppe in Abbildung 33, so wird das beschriebene Verhalten graphisch ersichtlich. Die untersuchten Embryonen der Kontrollgruppe reagieren adäquat auf den gesetzten Reiz mit einem initialen *C-Bend*, gefolgt von einer Gegenbewegung und sich anschließenden kräftigen Schwimmbewegungen, um sich von der Quelle des Reizes zu entfernen. Hierbei nimmt die Amplitude mit zunehmender Entfernung und Zeit ab. Vergleicht man dies mit dem Verhalten der mit **Bortezomib (4)** (25  $\mu$ M, 48 h) behandelten Embryonen so fällt ein äußerst starker Unterschied der Graphen auf. Es kommt zu extrem abgeschwächten Amplituden der Bewegungen, die bei näherer Betrachtung auch noch äußerst chaotisch bzw. irregulär ausfallen. Dies äußert sich in einer verringerten Reaktion auf den gesetzten Reiz und bei der genauen Bildanalyse ist es den Embryonen nicht möglich sich mit geordneten Bewegungen vom Ort des Stimulus zu entfernen. Embryonen die mit einer höheren Konzentration an **Bortezomib (4)** (50  $\mu$ M, 24 h) inkubiert wurden, zeigten gar keinen verbleibenden Fluchtreflex. Betrachtet man die Graphen, in denen die ermittelten Werte für die Inkubation der Embryonen mit **BSc5376 (143)** aufgetragen sind, so fällt auf, dass diese einen ähnlichen Fluchtreflex wie die Kontrolle zeigen. Die Reaktionen auf den Reiz sind vergleichbar mit denen der Kontrollgruppe, wobei die generelle Dauer etwas erhöht ist. Ein weiterer großer Unterschied ist bei der Reaktion auf den Berührungsstimulus im Vergleich zwischen der Kontrolle, **Bortezomib (4)**- und **BSc5376 (143)**-behandelten Embryonen feststellbar. Während die Kontrollgruppe auf etwa 50% der gesetzten Stimuli ansprach, wurde bei den Embryonen, die mit **Bortezomib (4)** inkubiert wurden, eine deutliche Abnahme der Reaktion (< 10%) beobachtet. Diese Ergebnisse deuten somit neben der Ausbildung einer peripheren Neuropathie auch auf eine ausgeprägte sensorische Neuropathie hin. Die mit **BSc5376 (143)** behandelten Embryonen zeigten eine ähnliche Ansprechrate wie die Kontrollgruppe. Interessanterweise konnte bei Embryonen, die mit einer höheren Dosis **BSc5376 (143)** behandelt wurden, eine gesteigerte Sensitivität (bis zu 100%) festgestellt werden.

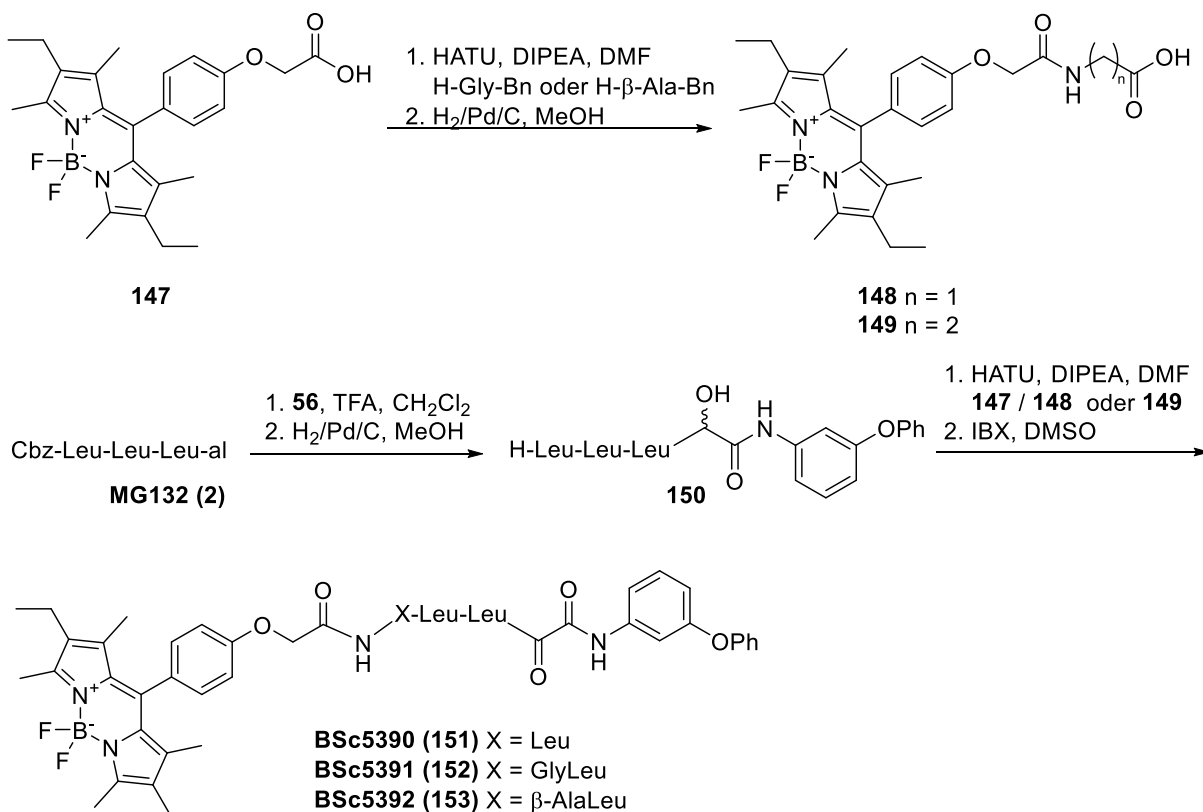
Die vorliegenden Ergebnisse des Fluchtreflex-Assays deuten darauf hin, dass die Leitstruktur **BSc5376 (143)** vermutlich keine relevanten *off-target*-Effekte aufweist. Es kommt zu keinerlei Beeinträchtigung des Fluchtreflexes sowie der sensorischen Reaktion bei der Behandlung von Zebrafischembryonen. **Bortezomib (4)** wirkt sich hingegen in einer deutlichen Verschlechterung der sensorischen Fähigkeiten sowie einer ausgeprägten Störung des Fluchtreflexes aus.

Nachdem somit das vorliegende Assay in Aufbau sowie Analyse etabliert werden konnte, sollte es zukünftig standardmäßig für die weitere Charakterisierung neuentwickelter Substanzen verwendet werden. Somit können Fluchreflexe für die präklinische Beurteilung der Sicherheit von Wirkstoffen analysiert werden und erlauben dadurch eine effektivere und auch kostengünstigere Wirkstoffentwicklung. Es handelt sich um eine tierschutzkonforme Alternativen zu Säugetierversuchen und liefert wertvolle biologische Daten an lebenden Organismen.



### 3.1.4.2. Synthese der BODIPY-konjugierten Proteasom-Inhibitoren (151 – 153)

Für die Synthese der BODIPY-konjugierten Proteasom-Inhibitoren auf Basis von **BSc5322 (72)** wurden zunächst die entsprechenden BODIPY-konjugierten Carbonsäuren (**147**, **148** und **149**) benötigt, die anschließend mit dem *N*-terminal entschützten  $\alpha$ -Hydroxyamid **150** von **BSc5322 (72)** gekuppelt und schlussendlich zum entsprechenden  $\alpha$ -Ketoamid oxidiert werden sollten. Die entsprechende Syntheseroute ist in Schema 13 dargestellt.



**Schema 13:** Synthese der BODIPY-konjugierten Proteasominhibitoren **BSc5390 (151)** – **BSc5392 (153)**.

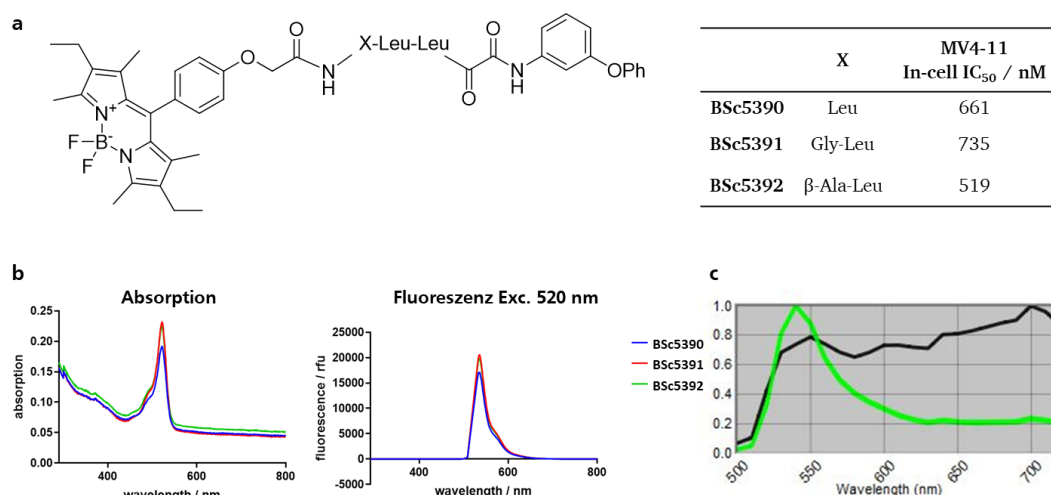
Die Synthese der BODIPY-konjugierten Carbonsäure **147** erfolgte in Anlehnung an die Literatur.<sup>[134]</sup> Diese wurde anschließend entweder mit Benzyl-geschütztem Glycin oder Benzyl-geschütztem  $\beta$ -Alanin unter Standard-Peptidkuppelungsbedingungen, mit HATU und DIPEA als Base in DMF, zu den entsprechenden Benzyl-geschützten Amiden umgesetzt. Im Folgenden wurden diese mit 10% Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre in Methanol entschützt um die freien Säuren **148** und **149** zu erhalten. Für die Synthese des  $\alpha$ -Hydroxyamids wurde zunächst analog dem bisherigen Vorgehen **MG132 (2)**, das *meta*-Phenoxy-Isocyanat **56** und TFA in einer *Passerini*-Reaktion zum entsprechenden  $\alpha$ -Hydroxyamid umgesetzt, das anschließend mit 10% Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre in Methanol *N*-terminal entschützt wurde. Das freie Amin **150** wurde anschließend mit der entsprechenden BODIPY-konjugierten Carbonsäure **147** – **149** mit HATU und DIPEA in DMF gekuppelt. Abschließend wurden diese direkt mittels IBX in DMSO zu den entsprechenden BODIPY-konjugierten  $\alpha$ -Ketoamiden **151** – **153** oxidiert.

An die Synthese der fluoreszenten Proteasom-Inhibitoren schloss sich deren biochemische sowie physikochemische Evaluierung an.

### 3.1.4.3. Physikochemische und biochemische Evaluation von BODIPY-konjugierten Proteasom-Inhibitoren

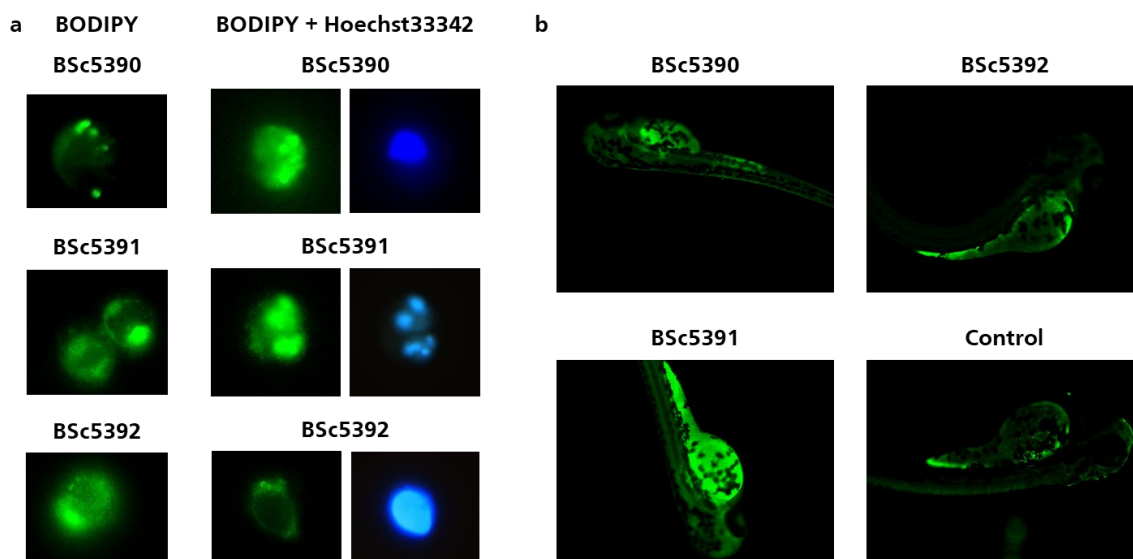
Die BODIPY-konjugierten Proteasom-Inhibitoren **BSc5390 (151)** – **BSc5392 (153)** wurden zunächst auf ihre inhibitorische Wirkung auf die intrazelluläre Umsetzung von **BSc5098 (146)** getestet, um den entsprechenden zellulären IC<sub>50</sub>-Wert zu bestimmen (Abbildung 35 a). Die fluoreszenten Derivate zeigen hierbei eine ähnliche Inhibitionsstärke wie die Ausgangsverbindung **BSc5322 (72)** bei 1 h Inkubationszeit in MV4-11-Zellen. Aufgrund der angeknüpften BODIPY-Gruppe werden offensichtlich die pharmakologischen Eigenschaften etwas verändert, was zu einer niedrigeren Inhibition führt. Allerdings sind die ermittelten Werte im höheren nanomolaren Bereich durchaus ausreichend um die Verbindungen als *activity-based probes* verwenden zu können. Die Inhibition der zellulären Substratumsetzung zeigt außerdem auch eine Zellgängigkeit, eines der Hauptkriterien der Substanzen auf.

In der Reihe der BODIPYs zeigt **BSc5392 (153)** die höchste inhibitorische Aktivität. Vermutlich sorgt der hochflexible  $\beta$ -Alanin-Linker dafür, dass bei dieser Substanz die bestmögliche Liganden-bindung erzielt werden kann. Es folgen mit absteigender Aktivität **BSc5390 (151)**, wobei der BODIPY-Rest direkt an den N-Terminus gekuppelt wurde und zuletzt die Glycin-verbrückte Version **BSc5391 (152)**. Die geringere Inhibitionsstärke lässt sich vermutlich durch die mangelnde Flexibilität der Linker erklären. Auch wäre es denkbar, dass es zur Ausbildung intramolekularer Wechselwirkungen kommt, die zu einer Konformationsänderung führen und somit eine effektivere Protein-Liganden-Interaktion verhindern. Außerdem kann sich die starke Erhöhung des Molekulargewichts durch die Einführung der BODIPY- sowie der Linker-Gruppe negativ auf die Zellpermeabilität auswirken.



**Abbildung 35:** (a) Strukturen der BODIPY-Konjugate mit *In-cell* IC<sub>50</sub> der Proteasominhibition. (b) Ermittelte Absorptions- und Fluoreszenzspektren in Acetonitril. (c) Normiertes Spektrum (grün) und Hintergrundfluoreszenz (schwarz) aufgenommen mit dem Nuance Fx Imaging System an einem Zeiss AxioScope A.1. Die Fluoreszenz wurde mit einem AF488 Fluoreszenzfilter in einem Wellenlängenbereich von 500 – 720 nm ermittelt.

Nachdem die drei entwickelten BODIPY-Derivate auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht wurden, folgte die Analyse der Fluoreszenz-Eigenschaften. Hierbei zeigte sich bei allen drei Substanzen, dass die Fluoreszenz-Eigenschaften der BODIPY-Gruppe durch das Kuppeln mit dem Inhibitor fast nicht verändert wurden. Die Derivate **BSc5390 (151)** – **BSc5392 (153)** besitzen alle ein Absorptionsmaximum bei ~520 nm. Das Emissionsmaximum bei dieser Wellenlänge liegt bei 540 nm und führt somit zu einer Stokes-Verschiebung von 20 nm (Abbildung 35 b). Diese Verschiebung ist ausreichend für eine gezielte, selektive Detektion der Substanzen.



**Abbildung 36:** (a) Färbung von MV4-11 Zellen mit den Verbindungen **BSc5390 (151) – BSc5392 (153)** mit oder ohne Hoechst33342 DNA-Farbstoff (2500 ms Belichtungszeit, Filter 365 nm oder AF488, 40x Vergrößerung). (b) Aufnahme der fluoreszenten Inhibitoren in *Danio rerio* Embryonen (3225.5 ms Belichtungszeit; Filter AF488, 5x Vergrößerung).

Im Anschluss an die physikochemische Evaluierung wurden MV4-11-Zellen mit den fluoreszenten Inhibitoren (10  $\mu$ M Inhibitor) für 1 h inkubiert, gewaschen und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Ein Teil der MV4-11-Zellen wurde außerdem ebenfalls mit dem DNA-Farbstoff **Hoechst33342** gefärbt, um eine Lokalisierung des Zellkerns zu ermöglichen. Eine weitere Verfeinerung der Aufnahmen erfolgte mittels Detektion mit einem multispektralen *Nuance Fx* Detektor, durch den eine Unterscheidung von Fluoreszenzspektren einer biologischen Probe ermöglicht wird. Es wurde ein ähnliches Spektrum wie bei der Messung in Acetonitril detektiert (Abbildung 35 c). Der Vorteil dieser Methode besteht in der Möglichkeit unterschiedliche Fluoreszenzsignale in einer Probe zu detektieren und unerwünschte Signale sowie die Hintergrundfluoreszenz vom gesuchten Signal subtrahieren zu können. Somit wird eine spezifische Detektion bestimmter Fluorophore möglich. Nach Inkubation der Zellen mit **BSc5390 (151) – BSc5392 (153)** wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (BODIPYs) oder 365 nm (**Hoechst33342**) und einem *Longpass*-Emissionsfilter ab 510 nm untersucht (Abbildung 36 a). In MV4-11-Zellen sind die BODIPYs weitestgehend im Zytoplasma lokalisiert, was aufgrund des hauptsächlich dortigen Vorkommens des Proteasoms nicht verwunderlich ist. Dennoch ist ebenfalls eine leichte Fluoreszenz im Zellkern zu beobachten, was auf eine Zellkerngängigkeit der Inhibitoren schließen lässt. Des Weiteren tritt die Fluoreszenz meist in Clustern auf. Hierbei handelt es sich vermutlich um sogenannte Aggresome, eine Zusammenlagerung von polyubiquitinylierten Proteinen und Proteasomen. Das Auftreten der Aggresome ist hierbei ein bekanntes Phänomen, das bei der Behandlung von Zellen mit Proteasominhibitoren auftritt.<sup>[135]</sup> Hierbei handelt es sich somit auch um einen weiteren Hinweis, dass es sich bei den vorliegenden Inhibitoren um *activity-based-probes* handelt. Die aufgenommenen Bilder spiegeln die Ergebnisse von bisherigen Berichten über grün- bzw rot-verschobenen fluoreszenten peptidischen Aldehyden wider, die mit Proteasomen in Aggresomen kolokalisieren und eine selektive Proteasom-Detektion ermöglichen.<sup>[136-137]</sup>

Die Inkubation von dechorionierten *Danio rerio* Embryonen mit den BODIPY-markierten Proteasominhibitoren **BSc5390 (151) – BSc5392 (153)** erfolgte mit 25  $\mu$ M Inhibitor in E3-Medium bis 96 hpf (72 h Inkubationszeit). Es kann eine verstärkte Fluoreszenz beobachtet

---

werden, die auf eine Aufnahme der Substanzen schließen lässt (Abbildung 36 b). Die Aufnahme der Bilder erfolgte erneut an einem Fluoreszenzmikroskop, das mit dem *Nuance Fx* Detektor ausgerüstet ist. Die Aufnahme der fluoreszenten Ketoamide in *Danio rerio* Embryonen ist bei **BSc5391 (152)** am stärksten, gefolgt von **BSc5390 (151)** und **BSc5392 (153)**, die nur eine leicht erhöhte Fluoreszenz gegenüber der Kontrolle zeigen. Eine auftretende Fluoreszenz ist bei **BSc5390 (151)** und **BSc5392 (153)** vor allem im Verdauungstrakt erkennbar, was auf eine orale Aufnahme schließen lässt. **BSc5391 (152)** zeigt zusätzlich eine starke Intensität im Dottersack, wodurch auf eine deutlich gesteigerte Aufnahme der Substanz geschlossen werden kann. Alle drei Farbstoffe zeigen keine toxischen Effekte.

Die vorliegenden fluoreszenten Inhibitoren **BSc5390 (151)** – **BSc5392 (153)** konnten in den beschriebenen Experimenten ihre Wirksamkeit beweisen und eignen sich eventuell ebenfalls als Werkzeug für weitere zelluläre und biochemische Analysen, wie beispielsweise *SDS-PAGEs* und Western-Blots. Auch die Markierung des Proteasoms in Organismen und anschließende Detektion ist möglich. Dies könnte außerdem genutzt werden, um die Wirkung neuer Proteasominhibitoren *in vivo* durch eine gezielte Markierung des Proteasoms genauer zu analysieren.

## 3.2. Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und pharmakologische Evaluation von dual-kovalenten Immunoproteasom-Inhibitoren

### 3.2.1. Molekulare Modellierung von dual-kovalenten Immunoproteasom-Inhibitoren

In letzter Zeit ist das Immunoproteasom immer mehr in den Fokus der Forschung geraten, da es als molekulares Ziel für die pharmakologische Intervention bei Entzündungen, Autoimmun- und hämatologischen Erkrankungen, insbesondere Krebs, angesehen wird. Weiterhin wird es auch als Ziel bei der Behandlung von Krankheiten, die das zentrale Nervensystem betreffen und altersbedingten Leiden verfolgt. In diesem Teil der Arbeit sollten selektive Inhibitoren für das Immunoproteasom entwickelt werden, die sich die Tatsachen zu Nutze machen, dass im Gegensatz zum konstitutiven Proteasom, eine Belegung der S1-Tasche durch deutlich größere Reste möglich ist sowie das Vorhandensein von Cys48, das durch elektrophile Gruppen kovalent adressierbar ist. Erste Ansätze für den gezielten Angriff des nicht-katalytischen Cys48 in S4 wurden bereits durch *Groll et al.* durchgeführt.<sup>[25]</sup> Der vorgestellte Inhibitor **1-CA (19)** ist in der Lage im Lysat von THP-1-Zellen, die vermehrt iCP exprimieren, das Proteasom zu inhibieren. Dies führt zu einer verminderten Produktion von Zytokinen, wie beispielsweise TNF- $\alpha$ . Eine Inhibition der Zellviabilität konnte allerdings nicht beobachtet werden. In einem Patent der Firma Merck KGaA von *Klein et al.* sind des Weiteren erste Ansätze für dual-kovalente Inhibitoren zu finden, die neben Cys48 auch Thr1Oy mit einem Michael-Akzeptor angreifen (siehe Abbildung 37).<sup>[119]</sup> Die Strukturen besitzen eine deutlich geringere Molekülmasse als die üblichen Tri- oder Tetrapeptide und bewegen sich von Peptiden hin zu Peptoiden, wodurch eine orale Anwendung ermöglicht werden könnte. Die vorliegenden Erkenntnisse sollen genutzt werden, um dual-kovalente Inhibitoren zu entwickeln, die Cys48 angreifen und mit einer  $\alpha$ -Ketoamid-Kopfgruppe Thr1Oy binden, wodurch auch eine Besetzung der gestrichenen Seite möglich wird und was auf eine gesteigerte Selektivität hoffen lässt. Der Vorteil dieser dual-kovalenten Inhibition liegt in der hohen Selektivität. Vermutlich bildet sich zunächst ein kovalent-reversibler Komplex zwischen dem  $\alpha$ -Ketoamid und Thr1Oy aus, wodurch die Verweilzeit in der *active-site* verlängert wird. Dies wird gefolgt von einer irreversiblen Bindungsbildung mit Cys48 durch den Acrylamid-Rest. Die Verwendung von  $\alpha$ -Ketoamiden beruht auf dem Ansatz, dass die erste Bindungsbildung an Thr1 selektiver ablaufen soll, als bei der Verwendung von Boronaten. Diese können, wie bei **Bortezomib (4)**, eine geringere Selektivität aufweisen und zu Nebenwirkungen führen. Ein weiteres Ziel ist die entwickelten Moleküle nicht-peptidisch zu gestalten und somit das Molekulargewicht zu senken, wodurch eine bessere Ligandeneffizienz erreicht werden soll. Die entwickelten Verbindungen sind schematisch in Abbildung 37 dargestellt. Für die Belegung der S'-Seite des Bindekanals von  $\beta 5i$  sollen die entsprechenden Phenylamid-Substituenten von **BSc4999 (12)**, **BSc5322 (72)** und **BSc5376 (143)** verwendet werden. Eine gesteigerte Selektivität gegenüber  $\beta 5i$  soll außerdem durch die Einführung von Phenylalanin in P1 generiert werden, da die S1 Tasche im Gegensatz zum cCP deutlich größere Substituenten zulässt.

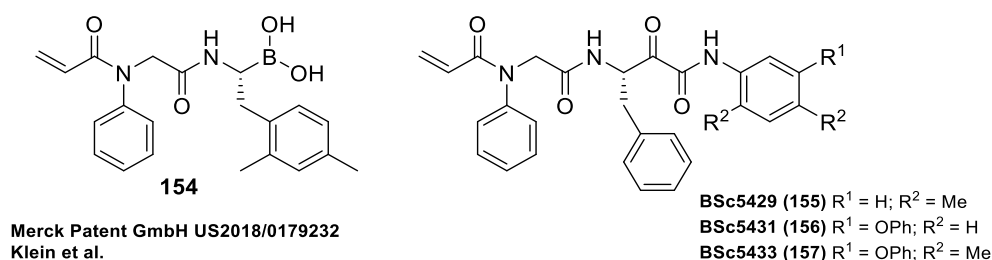
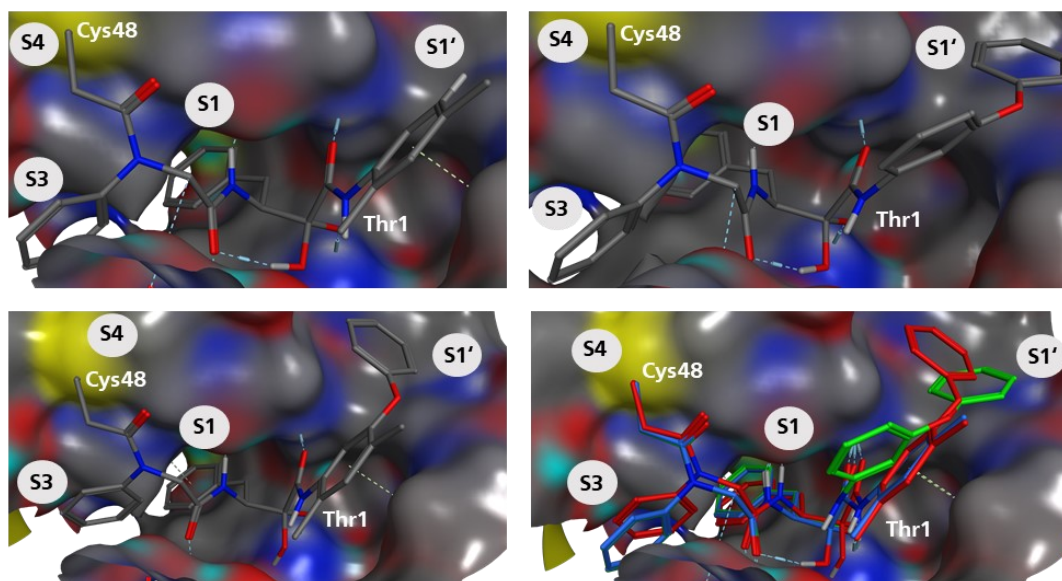


Abbildung 37: Ansätze zur dual-kovalenten Inhibition des Immunoproteasoms.



Die entwickelten Strukturen wurden zunächst, ähnlich zu dem Vorgehen in Abschnitt 3.1. beschrieben, ausgehend von der Kristallstruktur von **1CA** (**19**) im Komplex mit dem yCP  $\beta$ 5-G48C (PDB: 5CGG) modelliert, modifiziert und ebenfalls energieminimiert. Die modellierten Strukturen sind in Abbildung 38 dargestellt.



**Abbildung 38:** Molekulare Modellierung der Zielstrukturen **BSc5429** (**155**) (oben links), **BSc5431** (**156**) (oben rechts), **BSc5433** (**157**) (unten links) und die Überlagerung der drei Strukturen im yCP  $\beta$ 5-G48C (unten rechts).

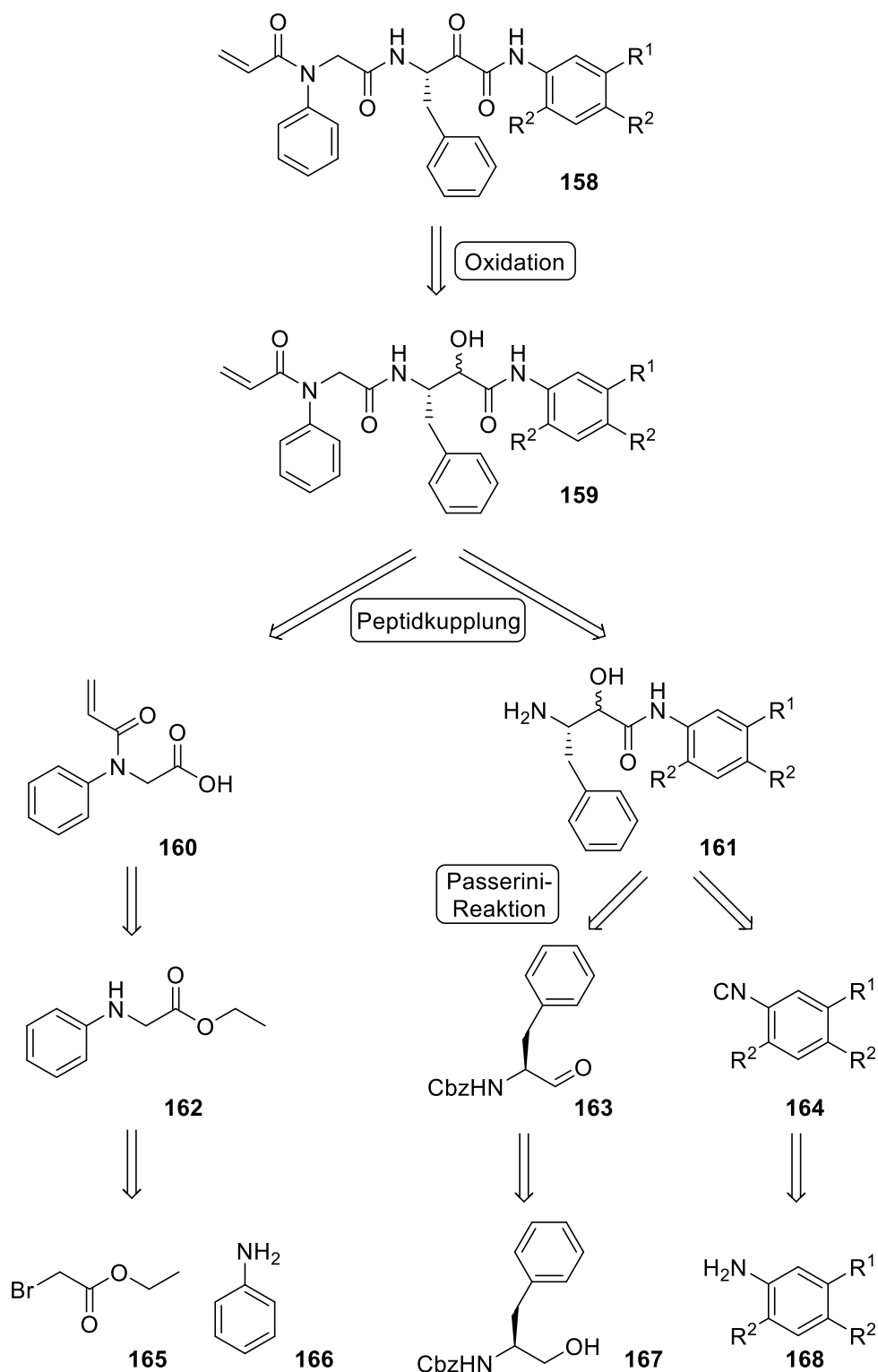
Die modellierten Ketoamide **BSc5429** (**155**), **BSc5431** (**156**) und **BSc5433** (**157**) zeigen in der S1'-Tasche die gleichen Ligandeninteraktionen wie die entsprechenden bereits vorgestellten Derivate **BSc4999** (**12**), **BSc5322** (**72**) und **BSc5376** (**143**). Der Dimethyl-Phenoxy-Substituent von **BSc5433** (**157**) ragt hierbei am weitesten in die S1'-Tasche hinein. Die S1-Tasche wird im direkten Vergleich mit der Leucin-Seitenkette durch den größeren Phenylrest deutlich stärker ausgefüllt. Das bei dem kovalenten Angriff an Thr1 entstandene Halbketal unterliegt ebenfalls dem gleichen Additionsmechanismus wie bei der Inhibition des konstitutiven Proteasoms. Dabei ragt der Carbonyl-Sauerstoff der Amid-Gruppe in das Oxyanion-Loch und die Phenylamid Reste in S1'. Der Acrylamid-Rest liegt in P4 und ist mittels Michael-Addition mit Cys48 irreversibel kovalent verknüpft. Die Substitution des Stickstoffs der N-terminalen Amidbindung mit dem Phenylrest, wodurch eine peptoid Struktur entsteht, erlaubt die Besetzung der S3-Tasche. Dies verhindert eine Orientierung des Peptidrückgrats in den Bindekanal, wodurch eine Positionierung des Acrylamid-Elektrophils in Richtung Cys48 bevorzugt wird. Peptide Strukturen sind im Gegensatz zu Peptiden außerdem meist metabolisch stabiler und die, durch die beschriebene Struktur bestimmte, forcierte Positionierung im  $\beta$ 5i Bindekanal verhindert die Adressierung von nicht-Ziel Proteasen. Die Überlagerung der drei Zielstrukturen zeigt, dass die Peptidrückgrate der Substanzen nahezu identisch positioniert sind. Da bei der Modellierung keine der drei Verbindungen einen strukturellen Vorteil für eine gesteigerte iCP Selektivität zeigte und die Belegung der S1'-Tasche im Hinblick auf einen möglichen Selektivitätsvorteil untersucht werden sollte, wurde eine Synthesestrategie für alle drei Strukturen entwickelt. Um den Einfluss einer möglichen Bindung an Cys48 besser einschätzen zu können wurden außerdem die entsprechenden Cys48-unreaktiven Derivate mit einem einfachen Propanamid-Rest synthetisiert. In Abschnitt 3.2.2. wird auf die Synthese und die biochemische Evaluation der Immunoproteasom spezifischen Inhibitoren eingegangen.



### 3.2.2. Synthese und biochemische Evaluation dual-kovalenter Immunoproteasom-Inhibitoren

#### 3.2.2.1. Retrosynthese der Zielstrukturen

In Schema 14 ist zunächst die schematische Retrosynthese der dual-kovalenten Inhibitoren dargestellt.

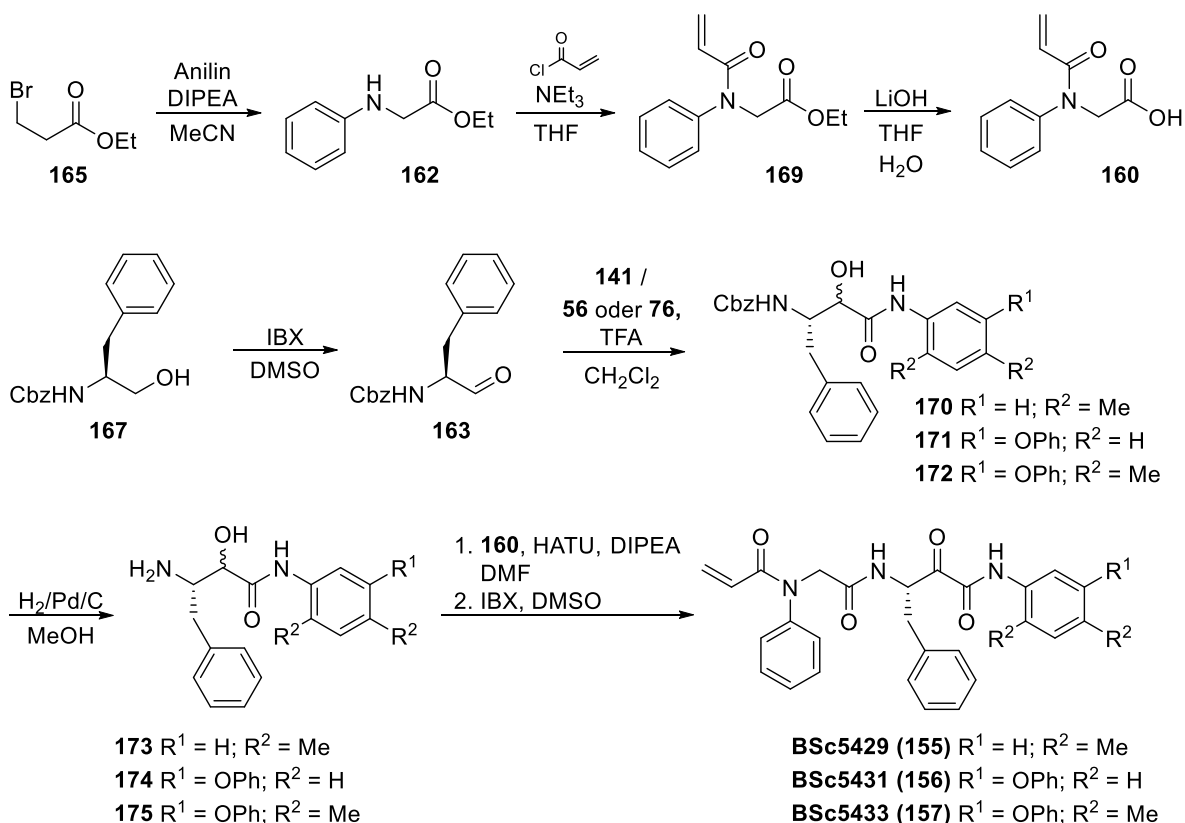


**Schema 14:** Retrosynthetische Betrachtung der Synthese der dual-kovalenten Inhibitoren.

In einer linearen Synthesestrategie wird zunächst die *N*-funktionalisierte Carbonsäure **160** ausgehend von Anilin **166** und Bromessigsäureethylester **165** über die Synthese des Phenylglycinesters **162** dargestellt. Das freie Amin **161** wird in einer *Passerini*-Reaktion aus Cbz-geschütztem Phenylalaninal **163**, das durch die Oxidation von Cbz-Phenylalaninol **167** erhalten wird und den aus Abschnitt 3.1. bekannten Isonitrilen **164** generiert. Diese werden ausgehend von den entsprechenden Anilinen **168** dargestellt. Die funktionalisierte Carbonsäure **160** und das entsprechende freie Amin **161** werden anschließend modular in einer Peptidkupplung umgesetzt, wodurch das  $\alpha$ -Hydroxyamid **159** erhalten wird, das im Anschluss zum  $\alpha$ -Ketoamid **158** oxidiert wird. Im Folgenden werden die einzelnen Syntheseschritte genauer beschrieben.

### 3.2.2.2. Synthese der dual-kovalenten $\alpha$ -Ketoamide **155** – **157**

Insgesamt wurden sechs verschiedene  $\alpha$ -Ketoamid-basierte Immunoproteasom-Inhibitoren synthetisiert und anschließend auf ihre inhibitorische Wirkung am isolierten iCP analysiert. Zu den Acrylamid-substituierten Inhibitoren wurden auch die analogen, Cys48-unreaktiven Inhibitoren synthetisiert, um den Einfluss der irreversiblen Bindung an Cys48 abschätzen zu können.

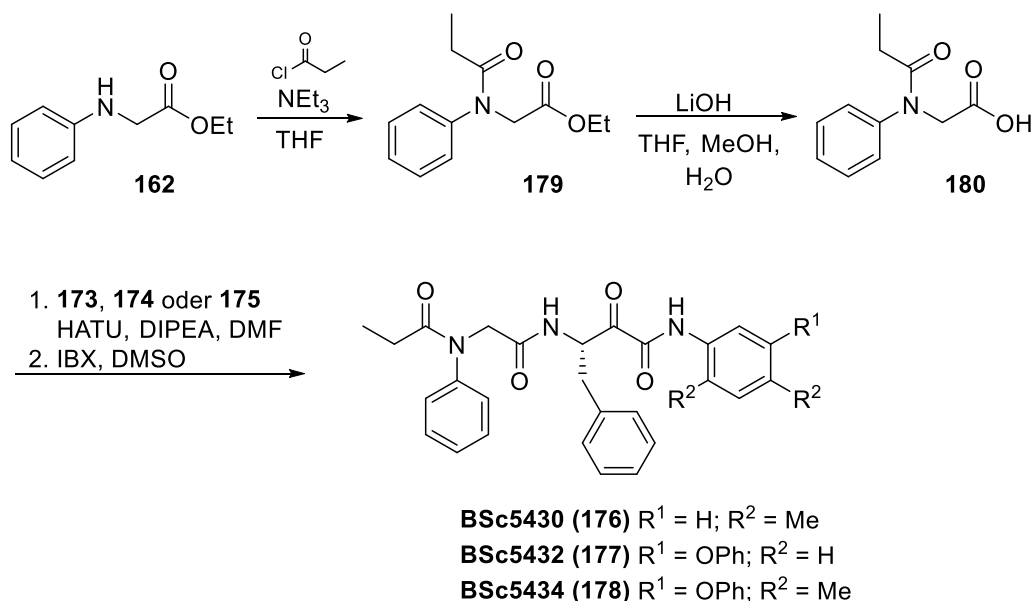


**Schema 15:** Syntheschema der dual-kovalenten Inhibitoren **BSc5439 (155)**, **BSc5431 (156)** und **BSc5433 (157)**.

Die Synthese der Acrylamid-substituierten Carbonsäure **160** wurde ausgehend von Bromessigsäureethylester **165** in drei Stufen dargestellt. Hierfür wurde zunächst Anilin **166** in einer nukleophilen Substitution mit dem Ester **165** und DIPEA als Base in Acetonitril umgesetzt. Anschließend konnte der erhaltene Phenylglycinester **162** am Stickstoffatom mit dem Elektrophil modifiziert werden. Der Ester **162** wurde in trockenem THF gelöst, Triethylamin als Base zugesetzt und anschließend mit Acryloylchlorid *N*-acyliert. Der acylierte Ethylester **169** wurde anschließend mit Lithiumhydroxid in einer Mischung aus THF und Wasser zur freien

Carbonsäure **160** hydrolysiert. Hierbei handelt es sich um den ersten modularen Baustein, der mit der Cys48-reaktiven Gruppe versehen ist und der sich einfach mittels Standard-Peptidkupplung an weitere Moleküle koppeln lässt, wodurch die Syntheseroute divergent wird. Die Synthese der entschützten  $\alpha$ -Hydroxyamide **173** – **175**, den zweiten modularen Bausteinen der Zielmoleküle startete mit der Oxidation von Cbz-geschütztem Phenylalaninol **167**. Dieses wurde in DMSO gelöst und mit dem hypervalenten Iod-Reagenz IBX zum entsprechenden Aldehyd **163** oxidiert. Dieser wurde anschließend mit den bereits aus Abschnitt 3.1. bekannten Isonitrilen **56**, **76** oder **141** mit TFA in Dichlormethan in einer *Passerini*-Multikomponentenreaktion zu den entsprechenden, geschützten  $\alpha$ -Hydroxyamiden **170** – **172** umgesetzt. Die Abspaltung der *N*-terminalen Cbz-Schutz-gruppe erfolgte hydrogenolytisch, indem die Edukte in Methanol vorgelegt wurden und mit Palladium auf Aktivkohle unter einer Wasserstoffatmosphäre entschützt wurden. Anschließend konnten die freie, *N*-acylierte Carbonsäure **160** und das entsprechende freie *N*-terminale Amin **173** – **175** in einer Peptidkupplung mit HATU und DIPEA als Base in DMF zu den Kupplungsprodukten umgesetzt werden. Die gebildeten  $\alpha$ -Hydroxyamide wurden daraufhin direkt mit IBX in DMSO zu den  $\alpha$ -Ketoamiden **BSc5429** (**155**), **BSc5431** (**156**) und **BSc5433** (**157**) oxidiert.

Somit konnten die modellierten dual-kovalenten Immunoproteasom-Inhibitoren mit den jeweiligen Phenylamid-Resten von **BSc4999** (**12**), **BSc5322** (**72**) und **BSc5376** (**143**) in einer divergenten, modularen Synthesestrategie erfolgreich synthetisiert werden. Im Folgenden wird auf die Synthese der Cys48-unreaktiven  $\alpha$ -Ketoamide **BSc5430** (**176**), **BSc5432** (**177**) und **BSc5434** (**178**) näher eingegangen.



**Schema 16:** Syntheschema der Cys48-unreaktiven  $\alpha$ -Ketoamide **BSc5430** (**176**), **BSc5432** (**177**) und **BSc5434** (**178**).

Für die Synthese der Cys48 unreaktiven Derivate wurde Phenylglycinester **162** statt mit Acrylsäurechlorid mit Propansäurechlorid und Triethylamin als Base in trockenem THF umgesetzt. Der erhaltene *N*-acylierte Ethylester **179** wurde anschließend mit Lithiumhydroxid in einer Mischung aus THF, Methanol und Wasser zur freien Carbonsäure **180** hydrolysiert. Interessanterweise führen die hierbei verwendeten Bedingungen bei der Hydrolyse des Acrylamid-substituierten Ethylesters zu einer deutlich schlechteren Ausbeute. Im Folgenden wurde die erhaltene freie Säure **180** ebenfalls mit den entsprechenden freien *N*-terminalen Aminen **173** – **175** mittels HATU und DIPEA in DMF zu den  $\alpha$ -Hydroxyamiden gekuppelt und

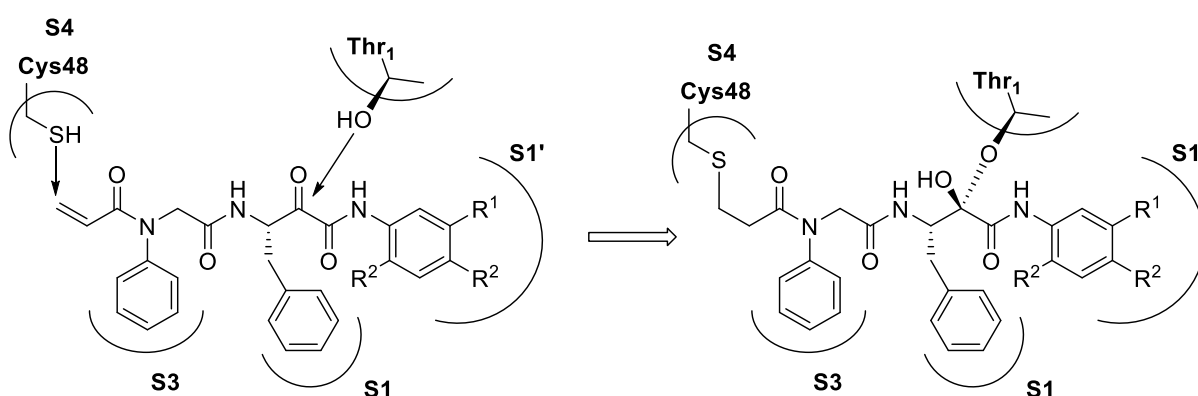
---

anschließend zu den Cys48-unreaktiven  $\alpha$ -Ketoamiden **BSc5430 (176)**, **BSc5432 (177)** und **BSc5434 (178)** oxidiert. Diese Inhibitoren sollen eine Einschätzung der Auswirkung einer zusätzlichen irreversibel-kovalenten Bindung mit Cys48 erlauben.

Die synthetisierten Substanzen wurden daraufhin auf ihre inhibitorische Aktivität auf das isolierte iCP untersucht. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt erläutert.

### 3.2.2.3. Pharmakologische Evaluierung der dual-kovalenten Immunoproteasom-Inhibitoren

Im Anschluss an die Synthese wurden die entwickelten Inhibitoren auf ihre Inhibition am isolierten Enzym untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Inhibitoren haben zum Ziel im  $\beta 5i$ -Substratbindekanal neben der Ausbildung einer kovalent-reversiblen Bindung zu Thr10y eine Michael-Addition mit Cys48 einzugehen, die zu einer irreversiblen Bindungsbildung führt und somit die Verweilzeit der Liganden im Zielprotein drastisch erhöht. Dieses Konzept ist in Schema 17 dargestellt. Neben den Verbindungen **BSc5429 (155)** – **BSc5434 (178)** wurden auch die beiden aus der Bachelorarbeit von Felix Krusch<sup>[138]</sup> stammenden Verbindungen **BSc5427 (181)** und **BSc5428 (182)** analysiert, die *N*-terminal nur acyliert und nicht mit einem Phenylring substituiert sind. Der S1'-adressierende Teil ist hierbei analog **BSc4999 (12)**.



**Schema 17:** Schematische dual-kovalente Bindungsbildung in der  $\beta 5i$ -Untereinheit des Immuno-Proteasoms.

Im anschließenden Immunoproteasom-Inhibitionsassay zeigten die Substanzen bei einer Konzentration von 100 nM Inhibitor moderate Inhibitionswerte von 20 – 40%. Lediglich **BSc5433 (157)** und **BSc5434 (178)**, die Inhibitoren mit der von **BSc5376 (143)** stammenden S1'-adressierenden Gruppe, zeigten keinerlei Aktivität. Der höchste Inhibitionswert der Serie wurde für **BSc5430 (176)** mit 40%, mit der Substitution von **BSc5322 (72)**, ermittelt. Das entsprechende Cys48-unreaktive Gegenstück **BSc5432 (177)** zeigte eine deutlich geringere Inhibition von 18%. Der Trend einer deutlich gesteigerten Inhibition durch die Acrylamid-Substitution, konnte allerdings bei keinem weiteren Inhibitorenpaar beobachtet werden. Die Referenzsubstanzen **BSc4999 (12)**, **BSc5322 (72)**, **BSc5376 (143)**, **Carfilzomib (8)** und **Bortezomib (4)** zeigen ein analoges Verhalten zu Kapitel 3.1. mit Inhibitionswerten zwischen 56% und 94%. Interessanterweise besitzt der Immunoproteasom-spezifische Inhibitor **ONX0914 (18)** nur eine moderate Aktivität von 29%.

Um die inhibitorischen Wirkungen der synthetisierten Substanzen besser einschätzen zu können, wurden die Inhibitionswerte des Weiteren bei einer Inhibitor-Konzentration von 1  $\mu$ M bestimmt. Hierbei zeigte sich für sämtliche in diesem Abschnitt entwickelten Substanzen ein drastischer Einbruch der Inhibitionsstärke, bis hin zu keiner feststellbaren inhibitorischen Wirkung bzw. sogar einem stärkeren Signal als das der Positivkontrolle. Im Gegensatz dazu stieg bei den Referenz-Inhibitoren die Inhibitionsstärke wie erwartet an.

Eine störende Eigenfluoreszenz der Inhibitoren ist auszuschließen, da zu Beginn des Assays der ermittelte Nullwert abgezogen wird und die Bestimmung der Inhibition über die Steigung der

Geraden des verbleibenden Substratumsatzes ermittelt wird. Auch eine Interaktion zwischen den Inhibitoren und dem Enzym, dem Substrat, dem verwendeten Reaktionspuffer oder dem freiwerdenden Fluorophor konnten durch Kontrollexperimente ausgeschlossen werden. Somit kommt es vermutlich bei höheren Inhibitor-Konzentrationen zur Aggregation der Moleküle, wodurch die inhibitorische Wirkung verhindert wird. Auch eine Mizellen-Bildung ist denkbar, die sich bei steigender Inhibitor-Konzentration verstärkt. Der treibende Faktor ist hierbei vermutlich das  $\alpha$ -Ketoamid-Motiv mit den entsprechenden *N*-Phenylamid-Termini, die die S1'-Tasche adressieren sollen, da bei der Verwendung von Boronaten als Elektrophile eine deutliche Inhibition durch die *Merck KGaA* ermittelt werden konnte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf eine Evaluierung der Substanzen in THP-1-Zellen verzichtet. In folgenden Projekten sollte das peptoid Rückgrat dahingegen modifiziert werden, sodass eine Aggregation verhindert wird. Auf diesen Punkt wird in Kapitel 4.2. nochmals näher eingegangen.

**Tabelle 7:** Übersicht der ermittelten Inhibitionswerte der Immunoproteasom-Inhibitoren.

Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Relative Inhibition $\beta 5i$ / %	
					c = 100 nM	c = 1 $\mu$ M
BSc5427 (181)	H	Me	H		22	6
BSc5429 (155)	H	Me	Ph		33	6
BSc5431 (156)	OPh	H	Ph		40	-11
BSc5433 (157)	OPh	Me	Ph		-4	-16
BSc5428 (182)	H	Me	H		20	9
BSc5430 (176)	H	Me	Ph		40	-5
BSc5432 (177)	OPh	H	Ph		18	-23
BSc5434 (178)	OPh	Me	Ph		-8	-3
BSc4999 (12)	H	Me	-	-	56	89
BSc5322 (72)	OPh	H	-	-	59	85
BSc5376 (143)	OPh	Me	-	-	76	89
Btz (4)	-	-	-	-	94	98
Cfz (8)	-	-	-	-	75	77
ONX0914 (18)	-	-	-	-	29	39

---

### 3.3. Synthese und pharmakologische Evaluation von Bisaminopyrimidinen als irreversibel-bindende FLT3-Inhibitoren

#### 3.3.1. Molekulare Modellierung und Identifikation der Leitstrukturen

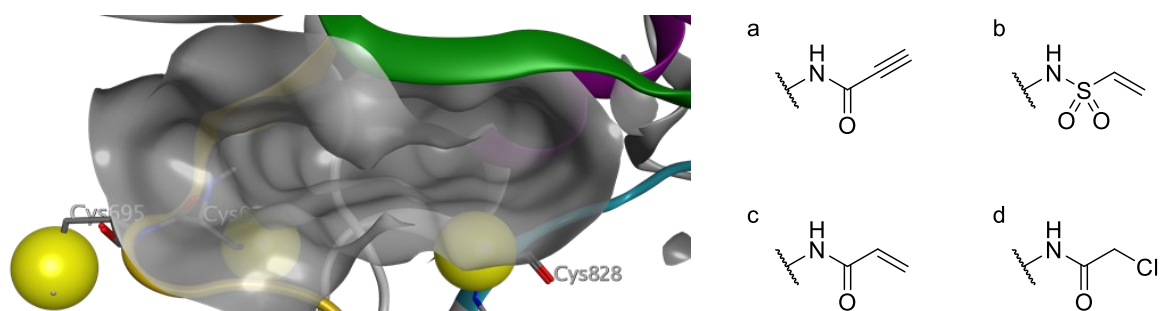
Wie in der Einleitung erwähnt, ist die FLT3 Kinase ein äußerst interessantes Zielprotein, dessen Inhibierung für die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie Gegenstand intensiver, gegenwärtiger Forschung darstellt. Da es durch eine Ausbildung von Therapie-resistenten Mutationen in der Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne, vor allem FLT3-D835Y, zu einer schnellen Resistenzbildung gegen die bereits bekannten FLT3-Inhibitoren kommt, ist ein Ansatz mit selektiven, irreversibel-bindenden Inhibitoren eine mögliche Lösung. Diese sollen dabei in der aktiven DFG-*in* Konformation selektiv einen geeigneten Rest einer Aminosäureseitenkette kovalent binden. Die DFG-*in* Konformation ist essenziell für die Bindung von ATP und sollte deshalb nicht zur Bildung von Resistenzen führen. Die Entwicklung der in diesem Abschnitt vorgestellten Inhibitoren erfolgte im Rahmen der Dissertation von *Dennis Bensinger* im Arbeitskreis *B. Schmidt*. Die Synthese der Bisaminopyrimidin-basierten Inhibitoren **BSc5300 (201)** – **BSc5307 (204)** und **BSc5309 (211)** – **BSc5314 (209)** erfolgte im Rahmen der vorliegenden Dissertation. Die biochemische und biologische Evaluierung erfolgte zusammen mit *Dennis Bensinger* und die entsprechenden Durchführungen sind bereits in dessen Dissertation beschrieben.<sup>[120]</sup>

Für die strukturbasierte Entwicklung von potenziellen Wirkstoffen, wird zunächst ein 3D-Modell benötigt, dass der genannten DFG-*in* Konformation entspricht. Da für diese zurzeit jedoch keine Struktur öffentlich zugänglich ist, wurde im Arbeitskreis *B. Schmidt* ein Homologie-Modell der FLT3 Kinase in der DFG-*in* Konformation entwickelt. Dieses wurde mit dem Programm MOE auf Basis der mit ADP-kokristallisierten Struktur der Rezeptor-Tyrosinkinase cKIT, die ebenfalls zur Familie der Klasse III-Rezeptortyrosinkinasen gehört, erstellt.<sup>[139]</sup> Hierbei ist die Struktur von cKIT der am besten geeignete Ausgangspunkt, da cKIT die höchste Sequenz-Identität und -Ähnlichkeit mit FLT3 von allen Kinasen aufweist. Im direkten Vergleich der FLT3-DFG-*out* und FLT3-DFG-*in* Modelle fällt auf, dass die Hinge-Region, die hydrophobe Region und die katalytische Schleife konserviert sind, während eine Bindung von ADP zu einer Reorientierung des DFG-Motivs vor der Aktivierungsschleife, der  $\alpha$ -C-Helix und der glycinreichen Schleife führt. Dabei wird Phe830 in der hydrophoben Tasche platziert, wodurch eine Bindung von Inhibitoren in der aktiven Konformation ermöglicht wird.

Für die Bindungsstärke von kovalenten Inhibitoren ist die räumliche Nähe der elektrophilen Gruppe zum Nukleophil und die Bildung eines stabilen, vorgelagerten, transienten, reversiblen Komplexes entscheidend. Das gewählte Grundgerüst sollte eine akzeptable, nicht zu starke, reversible Aktivität vorweisen und idealerweise ist die Struktur so klein gewählt, dass es möglich wird, durch definierte Interaktionen, insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen, Anhaltspunkte für die Aktivität oder Inaktivität zu erlangen. Für die Entwicklung von kovalenten FLT3-Inhibitoren eignet sich die Analyse bekannter *Hinge*-bindender Strukturen als geeigneter Ausgangspunkt. Hierbei werden die starken enthalpischen Wechselwirkungen ausgenutzt, die sich durch mono-, bi- oder tridentate Wechselwirkungen mit der *Hinge*-Region ergeben. Als Ausgangspunkt für die Entwicklung der kovalenten Inhibitoren wurde die frei zugängliche *BindingDB Database* nach eben solchen FLT3-Inhibitoren, mit unterschiedlichen *Hinge*-bindenden Grundgerüsten durchsucht. Daraus wurden 13 privilegierte Grundgerüste ausgewählt, die ein klar definiertes *Hinge*-bindendes Motiv besitzen und kein Substitutionsmuster enthalten, das typischerweise durch Typ-II-TKI genutzt wird (Auswahl in

Abbildung 40). Die ausgewählten Gruppen interagieren über mono-, bi- oder tridentate Wechselwirkungen mit den GK+1-Aminosäureresten (Glu692) und den GK+3-Resten (Cys694).

Für eine kovalente Bindungsstelle wurden die Cystein-Reste in der ATP-Bindetasche analysiert, wobei sich drei potenzielle Cysteine identifizieren lassen: Cys828, Cys694 und Cys695 (siehe Abbildung 39). Bei Cys694 und Cys695 handelt es sich um Aminosäuren, die einen Teil der *Hinge*-Region bilden, während Cys828 vor dem DFG-Motiv lokalisiert ist. Cys828 stellt außerdem den kovalenten Angriffspunkt für den Naturstoff **Hypothemycin (28)** da und scheint durch die ausgewählten *Hinge*-bindenden Strukturen am einfachsten adressierbar. Hierbei eignen sich besonders die Phenyleinheiten der vorgestellten Motive, die in das hintere Ende der Bindetasche zum DFG-Motiv gerichtet sind, als Anknüpfstelle für die elektrophilen Gruppen. Des Weiteren soll das *Hinge*-bindende Motiv möglichst nicht verändert werden, was für eine Interaktion mit Cys695 geschehen müsste. Eine Adressierung von Cys694 ist mit den vorgestellten Grundgerüsten nicht möglich, da diese mit Ihrer Oberfläche bereits auf der Oberfläche der Aminosäure liegen und somit kein Angriff möglich ist.

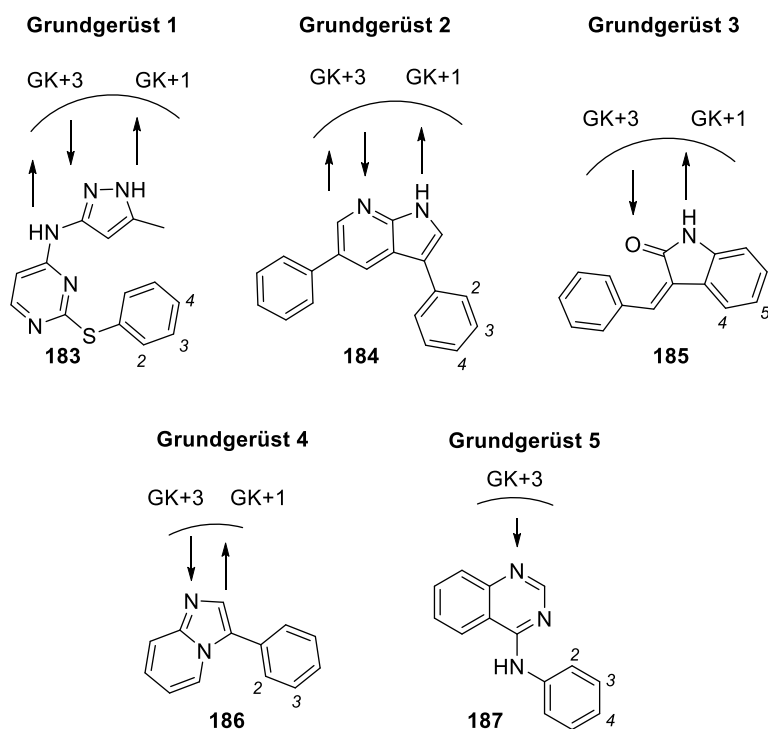


**Abbildung 39:** Position von Cys694, Cys695 (links) und Cys828 (rechts) in der ATP-Bindungstasche des FLT3-DFG-*in*-Homologie-Modells. Die nukleophilen Schwefelatome sind als Kugeln dargestellt (links). Strukturen der elektrophilen Gruppen: (a) Propargylamid, (b) Vinylsulfonamid, (c) Acrylamid und (d) 2-Chloracetamid.

Im Anschluss wurden vier chemisch und sterisch verschiedene elektrophile Kopfgruppen ausgewählt, die an die ausgewählten Grundgerüste geknüpft und anschließend mit einer virtuellen *Screening*-Strategie analysiert werden sollten (siehe Abbildung 39). Die Ausdehnung zwischen der Substitutionsstelle am Grundgerüst und dem jeweiligen elektrophilen Kohlenstoffatom beträgt bei den Propargylamid-, Vinylsulfon- und Acrylamid-Substitutionen ca. 5 Å. Das 2-Chloracetamid-Elektrophil hat eine Ausdehnung von 3.8 Å. Der Mechanismus der Bindungsbildung läuft bei Letzterem über eine nukleophile Substitution, während die anderen Elektrophile eine Michael-Addition mit dem nukleophilen Schwefelatom von Cys828 eingehen. Anschließend wurden die entsprechenden Substitutionspunkte an den ermittelten Grundgerüsten identifiziert, wobei auf eine synthetisch plausible Verknüpfung geachtet wurde (vergleiche Abbildung 40). Idealerweise wird in einer divergenten Synthesestrategie die elektrophile Gruppe möglichst spät eingeführt, was bei den vorliegenden Elektrophilen über ein Amin als Vorstufe relativ simpel zugänglich sein sollte.

Anschließend wurden die entwickelten Strukturen mit dem DOCKTITE-Skript kovalent *gedockt*, bewertet und die virtuelle Ligandeneffizienz bestimmt. Anhand dieser Parameter konnten von den 13 Grundgerüsten 5 Struktur motive identifiziert werden, wobei die besten Ergebnisse für das Bisaminopyrimidin-Grundgerüst **183** und das Indolinon-Grundgerüst **185** erzielt wurden. Die ermittelten Strukturen mit den potenziellen Anknüpfstellen sind in Abbildung 40 dargestellt.





**Abbildung 40:** Strukturen der ausgewählten reversiblen DFG-*in* bindenden Inhibitoren und deren Wechselwirkungen mit der *Hinge*-Region. Die Zahlen markieren geeignete Substitutionspunkte für elektrophile Gruppen. GK = *Gatekeeper*-Rest.

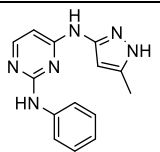
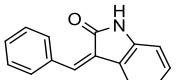
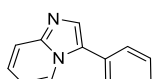
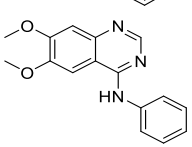
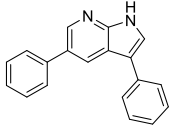
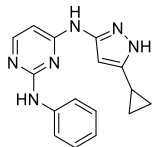
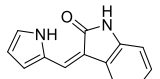
Um eine potente und selektive, kovalente Inhibition zu erreichen ist, wie anfangs schon erwähnt, eine moderate reversible Affinität zwischen dem Zielprotein und dem Liganden nötig, um den der Inaktivierung vorgelagerten reversiblen Bindungskomplex auszubilden. Deshalb wurden zunächst die Aktivitäten der identifizierten, reversiblen Grundgerüste gegenüber FLT3 und MV4-11-Zellen bestimmt. Die genannte Zelllinie exprimiert eine FLT3(ITD)-Mutation, deren Inhibierung die Apoptose der Zellen auslöst und deshalb als Maß für die Inhibition der Kinase angesehen werden kann und einen ersten Hinweis auf die therapeutische Wirksamkeit darstellt. Mit Hilfe der Daten sollte eine weitere Vorauswahl der Grundgerüste möglich werden, um die Trefferrate und Erfolgswahrscheinlichkeit der Entwicklungsstrategie zu verbessern. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Bei der Analyse der ermittelten Inhibitionswerte zeigt das Bisaminopyrimidin **BSc5224 (188)** die stärkste zytotoxische Aktivität (89% geringere Zellviabilität bei 10  $\mu$ M Inhibitor) und auch die stärkste Inhibition von FLT3wt. Eine vergleichbare Inhibition von FLT3wt und FLT3(D835Y) wird durch das Indolinon **BSc5230 (185)** erzielt. Hierbei handelt es sich außerdem um das kleinste der untersuchten Fragmente, das eine hohe virtuelle Ligandeneffizienz im virtuellen *Screening* zeigt. Bei dem Quinazolin **BSc5225 (189)** und dem Imidazopyridin **BSc5221 (186)** handelt es sich um weniger aktive Inhibitoren für FLT3(D835Y) und das 7-Azaindol **BSc5226 (184)** zeigt zwar eine hohe Inhibition von FLT3(D835Y), allerdings eine geringe Potenz gegen FLT3wt.

Da sämtliche getesteten Grundgerüste dieser Serie nur eine sehr geringe zytotoxische Aktivität zeigen ( $IC_{50} > 1000$  nM) wurden geringfügige Änderungen an den vielversprechendsten Verbindungen **BSc5224 (188)** und **BSc5230 (185)** vorgenommen, mit dem Ziel die zelluläre Aktivität zu steigern. Durch die Modifikation werden die *Hinge*-bindenden Motive und die Positionen der Elektrophile nicht beeinflusst und die Änderungen sind außerdem mit den

Docking-Ergebnissen vereinbar. Die 5-Methylgruppe des Pyrazolrings von **BSc5224 (188)** wurde durch einen Cyclopropyl-Rest ersetzt, wobei mit **BSc5231 (190)** eine Struktur generiert wurde, die für eine FLT3- und promiskue Kinase-Inhibition bekannt ist.<sup>[140]</sup> Die Substitution des Phenylrings bei **BSc5230 (185)** durch einen 2-Pyrrol-Ring soll die Interaktion des Liganden mit dem Zielprotein weiter verbessern. Die beiden modifizierten Strukturen **BSc5231 (190)** und **BSc5229 (191)** wurden anschließend ebenfalls auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber MV4-11-Zellen und FLT3 untersucht (siehe Tabelle 8).

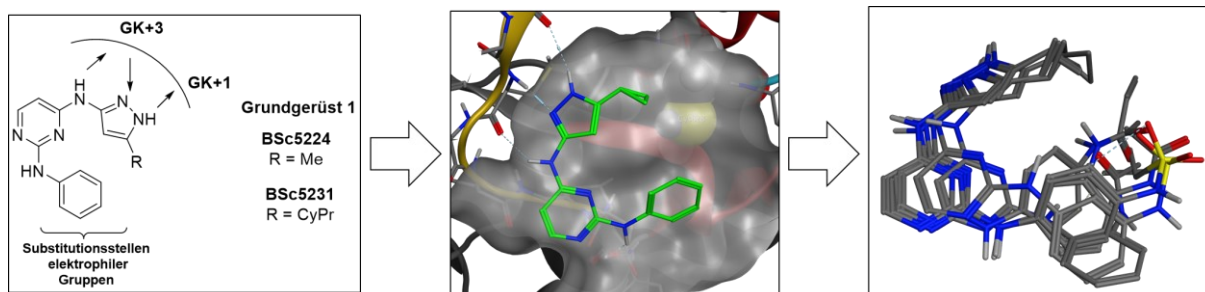
**Tabelle 8:** Übersicht der ermittelten Inhibitionswerte durch die ausgewählten, reversiblen Fragmente.

Struktur	Verbindung	Grundgerüst	IC <sub>50</sub> MV4-11 / nM	Relative Inhibition (c=1 $\mu$ M / %)	
				FLT3 <i>wt</i>	FLT3 (D835Y)
	<b>BSc5224 (188)</b>	1	> 1.000	82	15
	<b>BSc5230 (185)</b>	3	> 1.000	60	45
	<b>BSc5221 (186)</b>	4	> 1.000	76	8
	<b>BSc5225 (189)</b>	5	> 1.000	26	25
	<b>BSc5226 (184)</b>	2	> 1.000	25	83
	<b>BSc5231 (190)</b>	1	230 $\pm$ 53	98	88
	<b>BSc5229 (191)</b>	3	380 $\pm$ 21	97	86

Die modifizierten Strukturen zeigen eine deutliche Steigerung der Aktivität gegenüber den zugrundeliegenden Grundgerüsten. Das Bisaminopyrimidin-Derivat **BSc5231 (190)** zeigt eine deutlich gesteigerte Inhibition der Zellviabilität und eine vergleichbar hohe Inhibition von FLT3*wt* und FLT3(D835Y). Das Indolinon-Derivat **BSc5229 (191)** besitzt ebenfalls eine im Vergleich hohe zytotoxische Aktivität und eine mit **BSc5231 (190)** vergleichbare Inhibition von FLT3*wt* und FLT3(D835Y). Im direkten Vergleich ist die Liganden-Effizienz von **BSc5229 (191)** gegenüber der von **BSc5231 (190)** aufgrund der geringeren Größe erhöht.

Die beiden modifizierten Grundgerüst-Strukturen stellen somit einen effizienten Startpunkt für die Entwicklung irreversibel bindender FLT3-Inhibitoren dar. Ausgehend von den entwickelten Strukturen wurden diese mit ihren entsprechenden Modifikationen erneut mittels molekularer

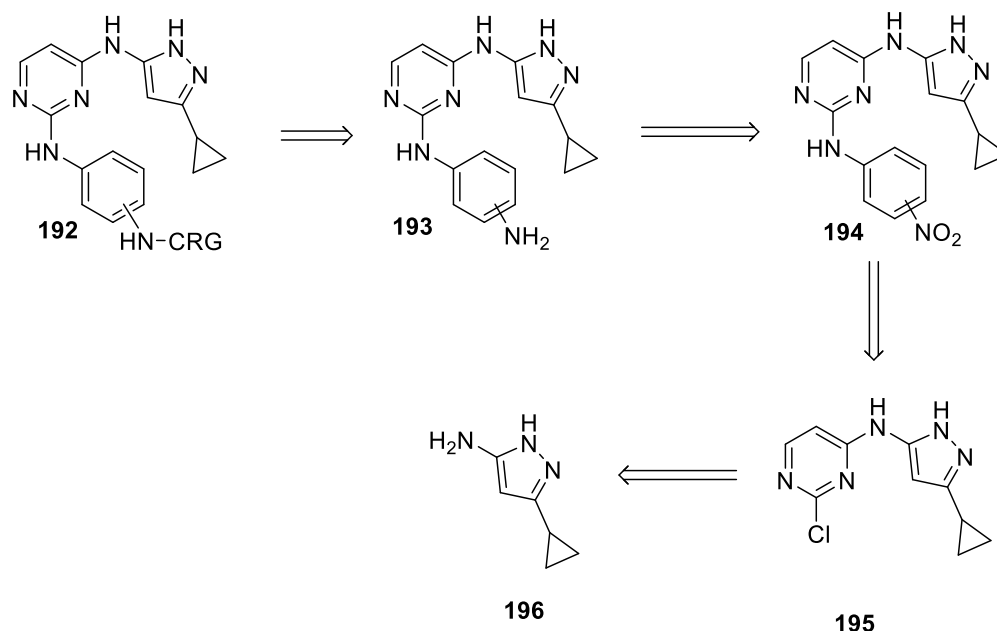
Modellierung untersucht und es zeigt sich, dass die Positionen der *Hinge*-bindenden Motive und der elektrophilen Gruppen dadurch nicht nennenswert verändert werden. Im Weiteren wurde sich im Rahmen dieser Dissertation mit der Synthese der Bisaminopyrimidin-Derivate und der entsprechenden Substitution mit den jeweiligen Elektrophilen in der 3- und 4-Position des Phenylrings beschäftigt. Die Ergebnisse der molekularen Modellierung der Bisaminopyrimidin-Inhibitoren sind in Abbildung 41 nochmals dargestellt.



**Abbildung 41:** Schema zur Entwicklung der Bisaminopyrimidin-basierten Inhibitoren. Rationales Design (links), reversibles (mitte) und kovalentes *Docking* (rechts). GK = *Gatekeeper*-Rest.

### 3.3.2. Retrosynthese der Zielstrukturen

In Schema 18 ist zunächst die Retrosynthese der kovalenten Inhibitoren dargestellt.



**Schema 18:** Retrosynthetische Betrachtung der Synthese der kovalenten Inhibitoren.

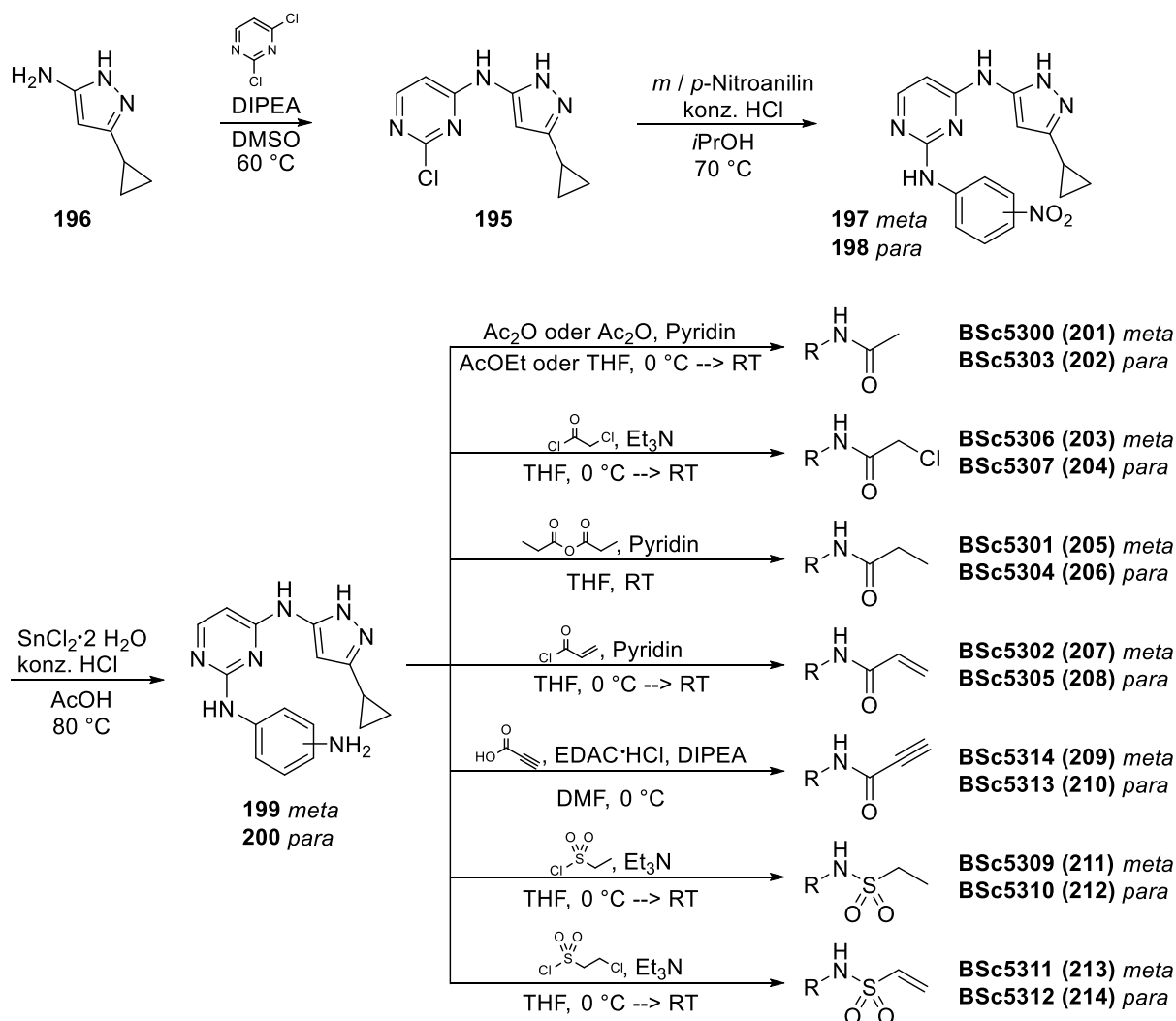
Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Cyclopropylpyrazolamin **196** soll in einer linearen Synthesestrategie das am Phenylring in 3- oder 4-Position substituierte Amin **192** dargestellt werden. Hierfür wird das Pyrazolamin **196** zunächst zum Chlorpyrimidin **195** umgesetzt, das nach Substitution am Chloratom und anschließender Reduktion das Amin **193** liefert. Es folgt die divergente Modifizierung der Amine mit den entsprechenden elektrophilen Gruppen zu den finalen potenziellen Inhibitoren **192**.

### 3.3.3. Synthese der Bisaminopyrimidin-basierten FLT3-Inhibitoren

Insgesamt wurden sieben verschiedene irreversibel bindende Bisaminopyrimidin-basierte FLT3-Inhibitoren synthetisiert. Außerdem wurden auch die analogen, Cys828-unreaktiven, aber sterisch identischen, Inhibitoren synthetisiert, um den Einfluss der verknüpfenden Amid- oder Sulfonamidgruppe auf die reversible Aktivität zu analysieren. Der ermittelte Unterschied zwischen der Aktivität des jeweiligen elektrophilen- und des Cys828-unreaktiven Derivates gibt einen starken Hinweis auf die Ausbildung einer kovalenten, irreversiblen Bindung zwischen Inhibitor und Protein. Die Reduktion der Nitrogruppe zum entsprechenden Amin erfolgt in der Syntheseroute als direkte Vorstufe der Modifikation mit den Elektrophilen, was eine divergente Synthese ermöglicht.

Die Synthese beginnt mit dem kommerziell erhältlichen Cyclopropylpyrazolamin **196**, das in einer nukleophilen aromatischen Substitution mit 2,4-Dichlorpyrimidin und DIPEA als Base in DMSO bei 60 °C zum Chlorpyrimidin **195** umgesetzt wird. Im zweiten Schritt wurde entweder *meta*- oder *para*-Nitroanilin über eine säurekatalysierte nukleophile aromatische Substitution mit Chlorpyrimidin **195** in Isopropanol bei 70 °C zu den entsprechenden Nitroderivaten **197** und **198** verknüpft. Diese konnten anschließend mit Zinn(II)-chlorid und konzentrierter

Salzsäure in Essigsäure bei 80 °C zu den Aminen **199** und **200** reduziert werden. Die synthetisierten Amine **199** und **200** bilden den Ausgangspunkt für die divergente Modifizierung zu den FLT3-Inhibitoren.



**Schema 19:** Syntheschema der FLT3-Inhibitoren **BSc53000 (201)** – **BSc5312 (214)**.

Die elektrophilen Gruppen wurden ausgehend von den entsprechenden Säurechloriden (für **BSc5302 (207)** und **BSc5305 (208)** – **BSc5307 (204)**) mittels Acylierung mit Triethylamin oder Pyridin als Base in Tetrahydrofuran oder den Sulfonsäurechloriden (**BSc5311 (213)** und **BSc5312 (214)**) dargestellt. Bei der Synthese der Vinylsulfon-Derivate **213** und **214** findet nach der anfänglichen Acylierung mit Chlorethansulfonylchlorid eine basenkatalysierte Eliminierung statt, die den jeweiligen finalen Inhibitor liefert. Die Synthese der Propiolamide **BSc5313 (209)** und **BSc5314 (210)** gestaltete sich in der Reihe am schwierigsten. Zunächst schlugen sämtliche Versuche für die Ausbildung der Peptidbindung fehl. Hierbei wurden verschiedene Kupplungsreagenzien wie DCC, DMAP, EDAC, HATU, DIC und PyBoP in verschiedenen Lösemitteln ausprobiert. Erst die Verwendung von PyBroP, das zur *in situ* Generierung von Carbonsäurebromiden genutzt wird, lieferte Spuren des Produkts, wobei die Ausbeute, unabhängig der Ansatzgröße, allerdings nicht ausreichte, um das Produkt in nennenswerter Menge zu isolieren. Daraufhin wurde die Kupplung mit einem 6-fachen Überschuss an Propiolsäure mit EDAC versucht, wobei *in situ* das Säureanhydrid gebildet werden sollte. Diese Variante führte zu vollständigem Umsatz des Amins zum Amid; eine

---

Isolierung des Produkts war allerdings nicht möglich. Auf die Vermutung hin, dass das gebildete Propiolamid bei erhöhter Temperatur am Rotationsverdampfer mit den nukleophilen Stickstoffatomen des Grundgerüsts reagiert, wurde nach vollständigem Umsatz das Lösungsmittel im Hochvakuum unter Kühlung entfernt. Diese Methode erlaubte die Isolierung der gewünschten Propiolamide **BSc5313 (209)** und **BSc5314 (210)** in einer ausreichenden Menge für die anschließende Testung, allerdings auch nur in sehr geringen Ausbeuten von 5% und 17%. Auf Grund der Reaktivität der eingeführten Gruppen und dem Vorhandensein nukleophiler Stickstoffe im Grundgerüst, sind bei sämtlichen synthetisierten Inhibitoren die Ausbeuten eher gering (5 – 40%).

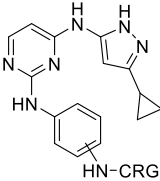

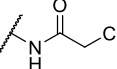
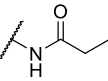
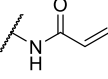
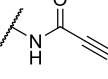
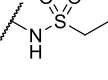
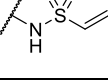
Die unreaktiven Gruppen wurden ausgehend von den entsprechenden Säureanhydriden (**BSc5300 (201)**, **BSc5301 (205)**, **BSc5303 (202)** und **BSc5304 (206)**) oder Ethansulfonylchlorid (**BSc5309 (211)** und **BSc5310 (212)**) mittels Acylierung eingeführt.

Sämtliche hier dargestellten Vertreter der dargestellten Bisaminopyrimidin-basierten FLT3-Inhibitoren wurden säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Wie auch in den vorherigen Kapiteln weisen die synthetisierten Inhibitoren, die für die biochemische Testung verwendet werden, eine Reinheit von mehr als 95% laut HPLC auf. Dies erlaubt die höchstmögliche Aktivität der Substanzen, verhindert aber auch Artefakte durch beispielsweise Nebenprodukte oder verbleibende Edukte. Die dargestellten Inhibitoren wurden anschließend auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber MV4-11-Zellen und FLT3 untersucht.

### 3.3.4. Pharmakologische Evaluation von Bisaminopyrimidinen als kovalent-bindende FLT3-Inhibitoren

In Tabelle 9 sind die ermittelten Werte der inhibitorischen Wirkung der synthetisierten Substanzen gegenüber MV4-11-Zellen und therapierelevanten FLT3-Mutanten dargestellt.<sup>[120]</sup>

**Tabelle 9:** Inhibitionswerte der Zellviabilität von MV4-11-Zellen und der FLT3(D835Y) und FLT3(ITD) Kinaseaktivität durch das Bisaminopyrimidin-Fragment **BSc5231 (190)** und den entsprechenden *m*- und *p*-substituierten Inhibitoren **BSc5300 (201)** – **BSc5314 (214)** mit elektrophilen Gruppen oder den analogen, unreaktiven Gruppen.<sup>[139]</sup>

	Verbindung	Substitution	IC <sub>50</sub> MV4-11 / nM	Relative Inhibition / %		
				FLT3(D835Y)		FLT3(ITD)
				c = 100 nM	c = 1 μM	c = 100 nM
-H	<b>BSc5231 (190)</b>	-	230 ± 53	52	88	27
	<b>BSc5300 (201)</b>	<i>m</i>	> 1.000	36	85	54
	<b>BSc5303 (202)</b>	<i>p</i>	> 1.000	45	86	82
	<b>BSc5306 (203)</b>	<i>m</i>	175 ± 2	33	90	74
	<b>BSc5307 (204)</b>	<i>p</i>	141 ± 13	39	93	74
	<b>BSc5301 (205)</b>	<i>m</i>	> 1.000	37	90	66
	<b>BSc5304 (206)</b>	<i>p</i>	> 1.000	34	80	22
	<b>BSc5302 (207)</b>	<i>m</i>	787 ± 100	22	81	50
	<b>BSc5305 (208)</b>	<i>p</i>	521 ± 65	29	84	59
	<b>BSc5314 (209)</b>	<i>m</i>	> 1.000	38	58	2
	<b>BSc5313 (210)</b>	<i>p</i>	> 1.000	45	54	17
	<b>BSc5309 (211)</b>	<i>m</i>	489 ± 17	32	92	59
	<b>BSc5310 (212)</b>	<i>p</i>	129 ± 16	72	96	86
	<b>BSc5311 (213)</b>	<i>m</i>	2.3 ± 0.1	47	90	73
	<b>BSc5312 (214)</b>	<i>p</i>	58 ± 16	86	95	99

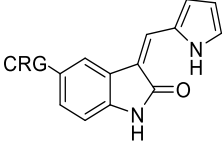
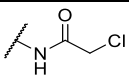
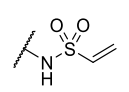
Im direkten Vergleich mit der Leitstruktur **BSc5231 (190)** zeigen die Vinylsulfon-Derivate **BSc5311 (213)** und **BSc5312 (214)** einen massiven Anstieg der zytotoxischen Aktivität auf MV4-11-Zellen, während die korrespondierenden, reversiblen Inhibitoren **BSc5309 (211)** und **BSc5310 (212)** eine ähnliche zytotoxische Aktivität wie die reversible Leitstruktur zeigen. Die Inhibition der FLT3(ITD)- und FLT3(D835Y)-Mutante zeigen ebenfalls einen deutlichen Anstieg durch die elektrophilen Derivate. Erstaunlicherweise zeigt **BSc5311 (213)** eine niedrigere Inhibition von FLT3(D835Y) als durch **BSc5312 (214)**, allerdings ist eine ca. 25-fach stärkere Wirkung auf die Zytotoxizität von MV4-11-Zellen zu beobachten, was auf eventuelle synergistische Effekte, die *off-target*-Effekte betreffen, zurückzuführen ist. Im Vergleich mit **BSc5231 (190)** zeigen die Acrylamid-Derivate **BSc5302 (207)** und **BSc5305 (208)** keine

verbesserte Inhibition der Zellviabilität, wobei die entsprechenden Cys828-unreaktiven Propionsäureamide **BSc5301 (205)** und **BSc5304 (206)** nahezu inaktiv sind. Bei den Propiolamiden **BSc5313 (210)** und **BSc5314 (209)** handelt es sich um die am wenigsten aktiven Verbindungen der Serie, die nur vernachlässigbare zytotoxische Aktivität zeigen. Vermutlich bedingt die sp-Hybridisierung der Alkine eine veränderte Konformation als das sp<sup>2</sup>-hybridisierte Addukt aus der Modellierung, was zu einer ungünstigen Position für eine kovalente Bindungsbildung führt. Die Cys828-unreaktiven Acetamide **BSc5300 (201)** und **BSc5303 (202)** führen, sowohl in *meta*- als auch *para*-Stellung, zu einer sehr niedrigen zytotoxischen Aktivität. Die 2-Chloracetamide **BSc5306 (203)** und **BSc5307 (204)** hingegen weisen eine leicht erhöhte zytotoxische Wirkung gegenüber **BSc5231 (190)** auf, was als Hinweis für die Ausbildung einer kovalenten Bindung angesehen werden kann. Die Inhibition von FLT3(D835Y) und FLT3(ITD) ist allerdings vergleichbar zu den Acetamiden.

Die vielversprechendsten Bisaminopyrimidin-basierten FLT3-Inhibitoren stellen somit die Vinylsulfonamide **BSc5311 (213)** und **BSc5312 (214)**, sowie die 2-Chloracetamide **BSc5306 (203)** und **BSc5307 (204)** dar.

Der ermittelte Trend, der in der Serie der Bisaminopyrimidin-basierten FLT3-Inhibitoren für die eingeführten elektrophilen Gruppen ersichtlich wird, konnte auch bei der Evaluation der Indolinon-basierten Inhibitoren durch weitere Mitglieder der Arbeitsgruppe beobachtet werden. Auch hier zeigte sich das Vinylsulfonamid mit **BSc5234 (216)** gefolgt von dem 2-Chloracetamid **BSc5237 (215)** als potenteste Verbindung (siehe Tabelle 10).<sup>[120]</sup>

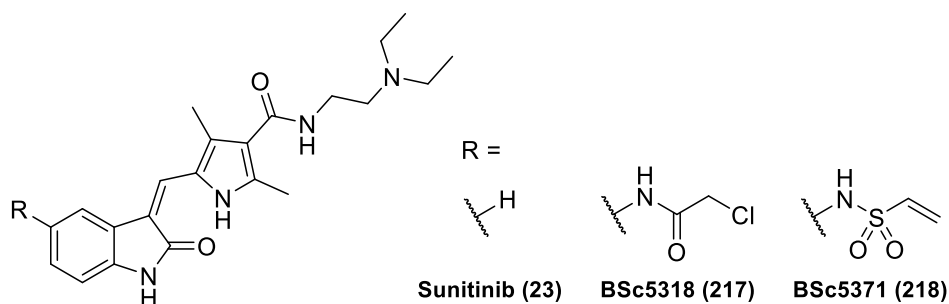
**Tabelle 10.** Inhibitionswerte der Zellviabilität von MV4-11-Zellen und der FLT3(D835Y) und FLT3(ITD) Kinaseaktivität durch die entsprechenden substituierten Inhibitoren mit elektrophilen Gruppen. Dargestellt sind nur die vielversprechendsten Verbindungen dieser Serie.<sup>[139]</sup>

	Verbindung	IC <sub>50</sub> MV4-11 / nM	Relative Inhibition / %		
			FLT3(D835Y)		FLT3(ITD)
			c = 100 nM	c = 1 μM	c = 100 nM
	<b>BSc5237 (215)</b>	72 ± 8	53	87	61
	<b>BSc5234 (216)</b>	67 ± 8	77	96	93

Da es sich bei den beiden evaluierten kovalent bindenden Strukturmotiven um Fragmente handelt, sollten im folgenden Schritt die ursprünglichen Struktur motive wieder in die kovalent bindenden Fragmente eingeführt werden. Daraus wird sich eine Steigerung der Selektivität, der Inhibitionsstärke gegenüber FLT3 und eine Erhöhung der zytotoxischen Aktivität erhofft. Hierbei ist die Verwendung des Bisaminopyrimidin-basierten Grundgerüsts für diesen Zweck jedoch weniger geeignet, da die Molekülmasse im Vergleich zum Indolinon-basierten Grundgerüst wesentlich höher ist sowie vermutlich auch eine promiske Kinase-Aktivität durch die Pyrazolamin-Gruppe erzielt wird. Ein erster Hinweis hierfür ist die Tatsache, dass sowohl das Bisaminopyrimidin Grundgerüst **BSc5224 (188)** sowie das Cyclopropyl-substituierte Derivat **BSc5231 (190)** eine potente Inhibition der GSK3-Kinasen aufweisen, während die Inhibition durch die reversiblen Indolinone vernachlässigbar ist.<sup>[139]</sup> Des Weiteren ist die



zytotoxische Aktivität des *meta*-substituierten Vinylsulfonamids **BSc5311 (213)** deutlich stärker als die der *para*-substituierten Variante **BSc5312 (214)**, während bei der Inhibition von FLT3(D835Y) sowie FLT3(ITD) der umgekehrte Trend beobachtet werden kann. Dies liefert Hinweise, dass die zytotoxische Aktivität zu einem Großteil durch die synergistische Inhibition anderer Kinasen hervorgerufen wird. Außerdem kommt es zu einer starken Inhibition der Zellviabilität in den nicht FLT3-abhängigen THP-1- und Jurkat-Zelllinien. Auch bei der Betrachtung der Ligandeneffizienz in MV4-11-Zellen, schneiden die Indolinon-basierten Inhibitoren **BSc5234 (216)** und **BSc5237 (215)** deutlich besser ab im Vergleich zu den Bisaminopyrimidin-basierten Inhibitoren. Auf Grund dieser Tatsachen, wurde für die weitere Optimierung das Indolinon-Grundgerüst ausgewählt, dass in Dockingstudien eine gute Übereinstimmung mit der Lage von **Sunitinib (23)** in der ATP-Bindetasche von cKIT und VEGFR2 zeigt.<sup>[139]</sup> Anschließend wurden durch weitere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe B. Schmidt Hybridstrukturen aus den beiden irreversiblen Indolinon-basierten Fragmenten **BSc5237 (215)** und **BSc5234 (216)** und der Ausgangsstruktur **Sunitinib (23)** entwickelt. Dies beinhaltet die Wiedereinführung der 2- und 4-Methylgruppe am Pyrrolring sowie der 3-Carboxamid-verbrückten Ethylendiethylamin-Gruppe (siehe Abbildung 42).<sup>[120]</sup>



**Abbildung 42:** Struktur der entwickelten irreversibel und reversibel bindenden Hybridstrukturen, basierend auf dem Indolinon Grundgerüst.<sup>[139]</sup>

Im Folgenden werden die weitergehenden Analysen der Inhibitoren kurz beschrieben. Der Fokus liegt hierbei auf den beiden irreversiblen Bisaminopyrimidin-basierten Inhibitoren **BSc5311 (213)** und **BSc5312 (214)**, die im Zuge dieser Arbeit entwickelt wurden. Diese werden in den folgenden Experimenten mit den vielversprechendsten Indolinon-Hybridstrukturen **BSc5318 (217)** und **BSc5371 (218)** sowie den bekannten Wirkstoffen **Sunitinib (23)**, **Crenolanib (26)** und **Hypothemycin (28)** verglichen.

### 3.3.5. Weitergehende Evaluation der irreversibel bindenden FLT3-Inhibitoren

Zunächst wurden die Inhibitoren in weiteren Zelllinien untersucht, wobei das inhibitorische Verhalten neben der FLT3(ITD) exprimierenden MV4-11-Zelllinie noch in einer FLT3*wt*-Zelllinie (THP-1), in der FLT3 zwar exprimiert wird, aber kein Onkogen darstellt, untersucht. Außerdem erfolgte eine Evaluation in einer FLT3-negativen Zelllinie (Jurkat).

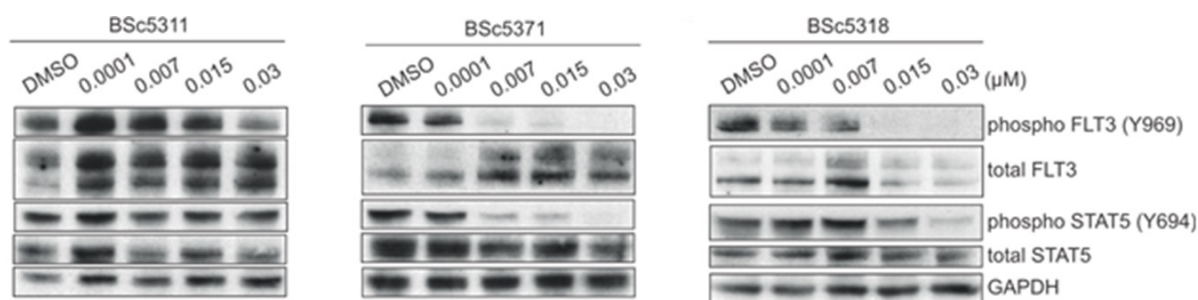
**Tabelle 11:** Inhibitionswerte der Zellviabilität von verschiedenen Zelllinien (72 h nach Behandlung), der FLT3(D835Y) und FLT3(ITD) Kinaseaktivität (100  $\mu$ M ATP, 30 min. Präinkubation) durch ausgewählte FLT3-Inhibitoren, sowie die Halbwertszeiten der Verbindungen gegenüber 100-fachem Überschuss an reduziertem Glutathion.<sup>[139]</sup>

Verbindung	IC <sub>50</sub> / nM			Relative Inhibition / %			t <sub>1/2</sub> / min
	MV4-11 FLT3(ITD)	THP1 FLT3 <i>wt</i>	Jurkat FLT3-neg	FLT3(D835Y) c = 0.1 $\mu$ M    c = 1 $\mu$ M	FLT3(ITD) c = 0.1 $\mu$ M		
BSc5311	2.3 $\pm$ 0.1	172 $\pm$ 24	44 $\pm$ 5	47      90	73		58
BSc5312	58 $\pm$ 16	514 $\pm$ 8	298 $\pm$ 10	86      95	99		82
BSc5318	21 $\pm$ 1	> 1.000	> 1.000	71      90	73		218
BSc5371	6.0 $\pm$ 0.3	> 1.000	> 1.000	95      100	86		51
Sunitinib	54 $\pm$ 1	> 1.000	> 1.000	82      96	70		-
Hypothemycin	15 $\pm$ 3	> 1.000	> 1.000	85      92	91		-
Crenolanib	12 $\pm$ 3	> 1.000	> 1.000	95      100	97		-

Wie bereits erwähnt, zeigen die Vinylsulfonamid-Derivate **BSc5311 (213)** und **BSc5312 (214)** eine starke zytotoxische Aktivität in MV4-11-Zellen. Allerdings ist auch eine starke Inhibition der Zellviabilität in FLT3-negativen Zellen (Jurkat) und eine etwas schwächere Aktivität in FLT3*wt*-Zellen (THP1) zu beobachten. Das *meta*-substituierte Bisaminopyrimidin-Derivat **BSc5311 (213)** zeigt hierbei in allen Zelllinien eine etwas stärkere Aktivität als das *para*-substituierte Derivat **BSc5312 (214)**. Setzt man diese Werte in Relation zu den ermittelten Werten für die Inhibition der isolierten Kinase, liefert dies den Hinweis, dass die zytotoxische Aktivität zu einem Großteil durch die synergistische Inhibition anderer Kinasen hervorgerufen wird. Es ist somit von einer geringeren Selektivität der Bisaminopyrimidin-basierten Inhibitoren auszugehen, wobei anscheinend das *para*-Derivat eine leicht erhöhte Selektivität gegenüber dem *meta*-Derivat besitzt. Im Gegensatz hierzu zeigen die optimierten elektrophilen Hybridstrukturen **BSc5318 (217)** und **BSc5371 (218)** eine deutliche Präferenz bei der Inhibition der Zellviabilität für die FLT3(ITD)-positive Zelllinie. Eine Inhibition der FLT3*wt*- sowie der FLT3-negativen Zelllinien ist bei relevanten Inhibitorkonzentrationen nicht zu beobachten, was für eine starke Selektivität spricht. Die potenteste Verbindung stellt erneut das Vinylsulfonamid-Derivat **BSc5371 (218)** dar, das eine stärkere zytotoxische Wirkung als die bekannten Inhibitoren **Sunitinib (23)**, **Crenolanib (26)** und dem Naturstoff **Hypothemycin (28)** zeigt. Bei der Inhibition der isolierten Kinase FLT3(D835Y) ist die Inhibition durch **BSc5371 (218)** ebenfalls deutlich erhöht im Vergleich zu **BSc5311 (213)** sowie **Sunitinib (23)**. Betrachtet man die Halbwertszeiten der Verbindungen gegenüber einem Überschuss an Glutathion, so wird ersichtlich, dass das Chloracetamid **BSc5318 (217)** deutlich weniger reaktiv ist als die Vinylsulfonamid-Derivate **BSc5311 (213)**, **BSc5312 (214)** und **BSc5371 (218)**.

Im Anschluss wurde die Wirkung der vielversprechendsten Inhibitoren auf die Proteinexpression und die Phosphorylierung mittels Western-Blots untersucht. Dies ermöglicht eine

Einschätzung der Stärke und der Selektivität der Inhibition von FLT3(ITD)-mutierten MV4-11-Zellen. Die Messungen wurden durch *Anjali Cremer*, in der Arbeitsgruppe von *Kimberly Stegmaier* am *Dana Faber Cancer Institute*, Boston, MA, USA, durchgeführt und zur Verfügung gestellt.<sup>[139]</sup> Für die Messungen wurden MV4-11-Zellen für eine Stunde mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt, anschließend lysiert, die Proteine wurden extrahiert und in einer *SDS-PAGE* getrennt. Die Bestimmung der Expressionslevel von FLT3, dem *Downstream*-Effektor STAT5 sowie dem Phosphorylierungsgrad von FLT3 und STAT5 erfolgte durch einen Western-Blot auf einer PVDF-Membran und der Inkubation mit Primär-Antikörpern. Wie generell üblich, wurde GAPDH als Ladekontrolle verwendet. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abbildung 43 dargestellt. Für **BSc5311 (213)** kann eine Inhibition der FLT3-Kinase ab einer Inhibitor-Konzentration von 30 nM beobachtet werden, was durch die entsprechende Autophosphorylierung der Kinase und der Phosphorylierung des Effektors STAT5 ersichtlich wird. Im Vergleich mit **BSc5371 (218)** und **BSc5318 (217)** ist für **BSc5311 (213)** die Inhibition der Phosphorylierung trotz der starken zytotoxischen Aktivität deutlich geringer, wobei **BSc5371 (218)** die höchste Aktivität der Serie zeigt, was auch mit der entsprechenden zytotoxischen Aktivität korreliert. Die Doppelbande, die für FLT3 zu beobachten ist, kommt dadurch zu Stande, da sowohl die glykosylierte sowie die freie Variante der Kinase in den Zellen vorliegt und beide durch den pFLT3-Antikörper markiert werden.

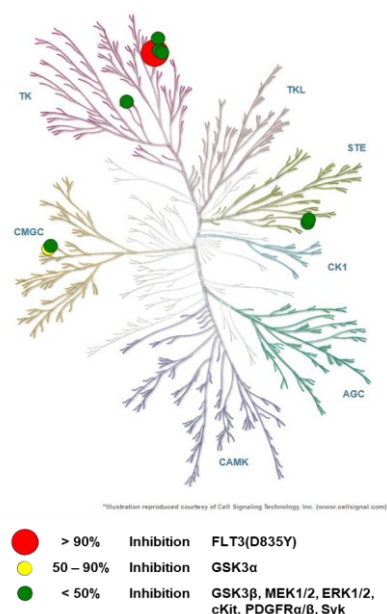


**Abbildung 43:** Western-Blot Analyse von phosphorylierten (*phospho*) sowie gesamt (*total*) FLT3- und STAT5-Leveln und der GAPDH Ladekontrolle.<sup>[139]</sup>

Weiterhin wurde die Selektivität von **BSc5311 (213)** gegenüber verschiedenen Kinasen bestimmt. Die Bestimmung erfolgt hierbei durch die *KinaseProfiler*-Plattform (Eurofins Discovery Services, Dundee, UK), bei einer Inhibitorkonzentration von 100 nM. Die ausgewählten Kinasen, deren Inhibition getestet wurde, exprimieren alle das konservierte Cystein vor dem DFG-Motiv. Die Inhibitionstärke gegenüber Kinasen aus verschiedenen Unterfamilien wurde mittels Kinase-Dendrogramm in Abbildung 44 dargestellt (KinMap).<sup>[141]</sup> Wie erwartet wird FLT(D835Y) mit Abstand am stärksten gegenüber allen getesteten Kinasen inhibiert, was einen Hinweis auf die Inhibition in der aktiven Konformation der Kinase liefert. Wie schon bei den reversiblen Bisaminopyrimidin-basierten Grundgerüsten **BSc5224 (188)** und **BSc5231 (190)** kommt es auch bei **BSc5311 (213)** zu einer potenten Inhibition von GSK3 $\alpha$  sowie zu einer etwas geringeren Inhibition von GSK3 $\beta$ . Diese beiden von FLT3 weit entfernten Kinasen exprimieren ebenfalls ein Cystein vor dem DFG-Motiv. Überraschenderweise wurden die weiteren getesteten Kinasen, die ebenfalls das Cystein vor dem DFG-Motiv enthalten, deutlich weniger inhibiert. Dies ist umso bemerkenswerter, da die Kinasen der PDGFR-Rezeptorfamilie ebenfalls wenig bis gar nicht inhibiert werden, obwohl **Sunitinib (23)** eine ähnlich hohe Affinität zu diesen Kinasen, wie zu FLT3 besitzt. ERK1 und ERK2 werden ebenfalls nicht nennenswert inhibiert, obwohl diese, sowie FLT3, ebenfalls durch **Hypothemycin (28)** inhibiert werden (siehe Abbildung 44).

Die ermittelten Inhibitionswerte lassen somit schließen, dass die starke zytotoxische Aktivität von **BSc5311 (213)** vermutlich auch auf die Ko-Inhibition von GSK3 $\alpha/\beta$  zurückzuführen ist. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass außer FLT3 und GSK3 keine weitere Kinase, die das konservierte Cystein vor dem DFG-Motiv exprimiert nennenswert bei einer Inhibitor-konzentration von 100 nM durch **BSc5311 (213)** inhibiert wird, was auf eine generell gute Selektivität schließen lässt.

Kinase	Restaktivität bei 0.1 $\mu$ M BSc5311 / %	Anmerkung
FLT3(D835Y) (h)	-1	Rot - 100
GSK3 $\alpha$ (h)	30	Gelb -50
GSK3 $\beta$ (h)	52	Grün - 50
MEK2(h)	75	Grün - 50
ERK2(h)	83	Grün - 50
cKit(h)	88	Grün - 50
ERK1(h)	92	Grün - 50
MEK1(h)	94	Grün - 50
PDGFR $\alpha$ (h)	100	Grün - 50
Syk(h)	105	Grün - 50
PDGFR $\beta$ (h)	118	Grün - 50



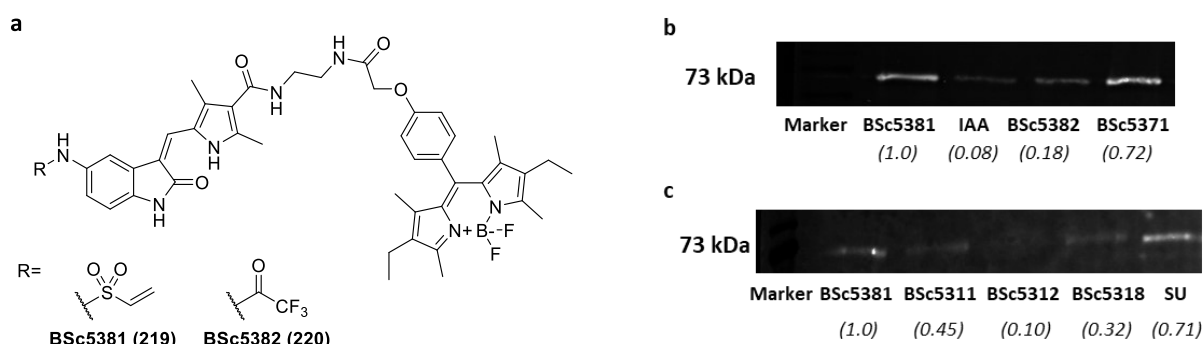
**Abbildung 44:** Selektivität in einer Auswahl von 10 Kinasen sowie FLT3(D835Y) (links) sowie die Darstellung der Selektivitäten in einem Kinase Dendrogramm mittels KinMap.<sup>[141]</sup>

Zusätzlich wurde die Zeit- und ATP-Abhängigkeit der Inhibition der FLT3-Kinase durch die aktivsten Verbindungen der Bisaminopyrimidin-Derivate **BSc5311 (213)** und **BSc5312 (214)** sowie der Indolinone **BSc5371 (218)** und **BSc5318 (217)** untersucht.<sup>[139]</sup> Als Referenzinhibitoren wurden **Sunitinib (23)** und **Crenolanib (26)** verwendet, die wie erwartet eine starke Abhängigkeit von der ATP-Konzentration zeigen. Da die Ausbildung einer irreversiblen Bindung zu einer nicht-Gleichgewichts-Inhibition führt, ist nur der reversible Enzym-Ligand-Komplex vor der irreversiblen, kovalenten Inaktivierung kompetitiv zur ATP-Bindung. Dies zeigt sich besonders bei **BSc5371 (218)** gefolgt von **BSc5318 (217)**. Bei den Bisamonopyrimidinen ist eine deutlich stärkere Änderung der Abnahme der Inhibitionsstärke gegenüber hohen ATP-Konzentrationen zu beobachten, wobei **BSc5311 (213)** seine inhibitorische Aktivität bei einer hohen ATP-Konzentration nahezu vollständig einbüßt. Dies lässt auf eine deutlich langsamere Kinetik der Inaktivierung durch die Bisaminopyrimidine sowie eine hohe ATP-Kompetitivität schließen.

Des Weiteren wurde eine Variation der Vorinkubationszeiten von Inhibitor mit der Kinase auf die Inhibition von FLT3(D835Y) und FLT3(ITT) untersucht.<sup>[139]</sup> Ein reversibel bindender Inhibitor bildet ein Gleichgewicht mit einem kompetitiven Substrat, was dazu führt, dass eine Variation der Vorinkubationszeit keine Änderungen der Inhibition verursacht. Jedoch sollte ein irreversibel bindender Inhibitor bei einer steigenden Vorinkubationszeit ohne kompetitives Substrat eine stärkere Inhibition zeigen. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Zeit verlängert wird, in der das reversible Gleichgewicht vorherrscht, dass zur kovalenten Bindungsbildung

führt. Bei der Inhibition von FLT3(D835Y) sowie FLT3(ITD) durch die entwickelten Inhibitoren wird eine starke Zeitabhängigkeit beobachtet, während die Inhibition durch **Crenolanib (26)** konstant bleibt. Die Inhibition von FLT3(D835Y) durch die Indolinon-Derivate ist bei den Experimenten zu sämtlichen Zeitpunkten deutlich höher als die Inhibition durch die Bisaminopyrimidine. Interessanterweise steigt die Inhibition von FLT3(ITD) erst mit längerer Inkubationszeit deutlich an, was auf eine langsamere Assoziation der Liganden an die mutierte Kinase schließen lässt.

Anschließend wurde das kovalente Bindungsverhalten der entwickelten, irreversiblen Inhibitoren an der isolierten Kinase mittels *SDS-PAGE* und anschließendem Western-Blot analysiert.<sup>[139]</sup> Hierfür wurde die isolierte Kinase FLT3(D835Y) zunächst mit den entsprechenden irreversibel bindenden Inhibitoren vorinkubiert und anschließend mit dem in der Arbeitsgruppe *B. Schmidt* entwickelten, fluoreszenzmarkierten, irreversibel bindenden Inhibitor **BSc5381 (219)** (siehe Abbildung 45) inkubiert. Die Proben wurden anschließend denaturiert, die Proteine durch Gelelektrophorese von überschüssigem Inhibitor getrennt und durch Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert, was eine fluoreszente Detektion ermöglicht. Die Blots wurden durch Anregung bei 488 nm und anschließender Detektion ausgewertet. Eine kovalente Markierung von FLT3(D835Y) durch **BSc5381 (219)** wird durch das Auftreten einer Bande bei 73 kDa (Molekülmasse des Kinasekonstrukts) nachgewiesen. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte mit der Software ImageJ.<sup>[142]</sup> Handelt es sich um einen irreversibel bindenden Inhibitor, wird dieser nicht vom Protein getrennt und es kann keine Fluoreszenzmarkierung durch **BSc5381 (219)** erfolgen. Reversibel bindende Inhibitoren werden durch **BSc5381 (219)** verdrängt und während der *SDS-PAGE* abgetrennt, weshalb es am Ende zu einem detektierbaren Fluoreszenzsignal kommt. Die entsprechenden Westen-Blots sind in Abbildung 45 dargestellt.



**Abbildung 45:** (a) Struktur der irreversibel bindenden BODIPY-Verbindungen **BSc5381 (219)** und der reversibel bindenden Verbindung **BSc5382 (220)**. (b) Western-Blot von FLT3(D835Y) nach Inkubation mit **BSc5381 (219)** oder **BSc5382 (220)** (100  $\mu$ M) und Alkylierung durch 2-Iodacetamid (IAA, 10 mM) und **BSc5371 (218)** (100  $\mu$ M) mit anschließender Inkubation mit **BSc5381 (219)** (100  $\mu$ M). (c) Western-Blot von FLT3(D835Y) nach Inkubation mit **BSc5381 (219)** (10  $\mu$ M) und Vorinkubation mit **BSc5311 (213)**, **BSc5312 (214)**, **BSc5318 (217)** und **Sunitinib (23)** (SU, je 100  $\mu$ M) gefolgt von Inkubation mit **BSc5381 (219)** (10  $\mu$ M).<sup>[139]</sup>

Der Nachweis der kovalenten Bindung von **BSc5381 (219)** konnte durch die Vorinkubation mit 2-Iodacetamid (IAA) bestätigt werden, indem eine kompetitive Alkylierung fast vollständig unterbunden wird. Die Vorinkubation von FLT3(D835Y) mit **BSc5371 (218)** (100  $\mu$ M) und anschließender Inkubation mit dem Fluorophor **BSc5381 (219)** (100  $\mu$ M) führt zu einem leichten Rückgang der Fluoreszenz (-28%), wobei eine Inkubation mit 50  $\mu$ M **BSc5381 (219)** das Fluoreszenzsignal um 41% senkt. Eine ähnliche Abnahme der Fluoreszenz konnte durch die Vorinkubation mit den irreversibel-bindenden Bisaminopyrimidinen **BSc5311 (213)** (-55%)

und **BSc5312 (214)** (-90%) sowie etwas weniger durch das Indolinon **BSc5318 (217)** (-68%) beobachtet werden. Diese Ergebnisse liefern somit einen weiteren Hinweis auf das vorliegende kovalente, irreversible Bindungsverhalten der entwickelten Inhibitoren. Die Vorinkubation mit dem reversiblen Inhibitor **Sunitinib (23)** senkt das Fluoreszenzsignal deutlich weniger, was einen Hinweis auf einen kompetitiven Bindungsmodus darstellt, da die deutlich höhere Inhibition von FLT(D385) durch **Sunitinib (23)** im Vergleich zu **BSc5381 (219)** zu einer starken Konkurrenz um die Bindungsstelle führt.

Abschließend wurden die entwickelten Inhibitoren noch in einem *Danio rerio* Toxizitätsassay, analog dem Vorgehen in Abschnitt 3.1.3.1., untersucht (siehe Tabelle 12).<sup>[120]</sup> Hierbei sollte die Biokompatibilität sowie die toxikologischen Effekte der irreversibel-bindenden Inhibitoren untersucht werden, um einen ersten Anhaltspunkt für die Toxizität der Substanzen zu erhalten.

**Tabelle 12:** Toxizität in *Danio rerio* Embryonen der wichtigsten Substanzen (Überleben in %).<sup>[120]</sup>

Substanz	Konz. / $\mu\text{M}$	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
<b>BSc5231 (190)</b>	50	0 %	0 %	0 %	0 %
	10	100 %	100 %	0 %	0 %
	1	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>BSc5311 (213)</b>	50	0 %	0 %	0 %	0 %
	10	100 %	100 %	100 %	100 %
	1	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>BSc5312 (214)</b>	50	100 %	100 %	100 %	100 %
	10	100 %	100 %	100 %	100 %
	1	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>BSc5318 (217)</b>	50	100 %	100 %	100 %	100 %
	10	100 %	100 %	100 %	100 %
	1	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>BSc5371 (218)</b>	50	100 %	100 %	100 %	100 %
	10	100 %	100 %	100 %	100 %
	1	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>Crenolanib (26)</b>	50	100 %	100 %	100 %	0 %
	10	100 %	100 %	100 %	100 %
	1	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>Sunitinib (23)</b>	50	100 %	100 %	100 %	100 %
	10	100 %	100 %	100 %	100 %
	1	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>Hypothemycin (28)</b>	50	100 %	100 %	100 %	0 %
	10	100 %	100 %	100 %	100 %
	1	100 %	100 %	100 %	100 %

Da in den Zebrafischembryonen, im Gegensatz zum Menschen, das adressierte Cystein vor dem DFG-Motiv der FLT3-Kinase durch ein Alanin ausgetauscht ist, erfolgt vorwiegend eine Evaluation von *off-target*-Effekten. Im Assay zeigen die Indolinon-basierten Derivate **BSc5318 (217)** und **BSc5371 (218)** zu keinem Zeitpunkt eine toxische Wirkung, was mit der Toxizität von **Sunitinib (23)**, **Crenolanib (26)** und **Hypothemycin (28)** vergleichbar ist. Im Gegensatz dazu, zeigt der Bisaminopyrimidin-basierte Inhibitor **BSc5311 (213)** eine erhöhte Toxizität, die ebenfalls bei dem entsprechenden Grundgerüst **BSc5231 (190)** beobachtet werden kann und somit einen Hinweis auf einen promiskuuosen Wirkmechanismus und somit eine geringere toxikologische Sicherheit gibt.

---

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

---

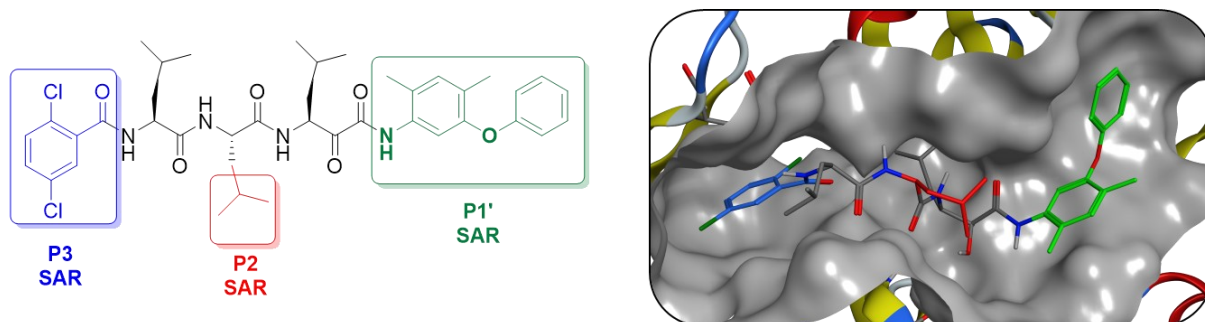
In der vorliegenden Arbeit wurde als übergeordnetes Ziel die systematische Anwendung interdisziplinärer Methoden des modernen Wirkstoffdesigns sowie deren Weiter- und Neuentwicklung verfolgt. Das prinzipielle Vorgehen des iterativen Verfahrens in den jeweiligen Projekten schließt hierbei die computergestützte Modellierung von potenziellen Wirkstoffen, gefolgt von der Hypothesenentwicklung möglicher Struktur-Aktivitätsbeziehungen sowie der anschließenden Synthese der Leitstrukturen und deren biochemische Evaluierung ein. Mit diesen Methoden wurde das Ziel verfolgt, hochaktive und hochselektive Substanzen zu entwickeln, die *in vivo* optimale Eigenschaften aufweisen und möglichst keine Nebenwirkungen zeigen. Das Wirkstoffdesign erfolgte in den Teilprojekten streng rational, wodurch der Zeit- und Materialaufwand optimiert werden konnte. Die bearbeiteten Teilprojekte gliedern sich in die Entwicklung von Inhibitoren für das konstitutive- sowie das Immunoproteasom sowie für die FLT3 Kinase und werden im Folgenden zusammengefasst.

### 4.1. Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und pharmakologische Evaluation von kovalent-reversiblen Inhibitoren für das konstitutive Proteasom

Mit **Bortezomib (4)**, **Carfilzomib (8)** und **Ixazomib (6)** sind mittlerweile drei Inhibitoren für das 20S-Proteasom für die Behandlung von schweren Tumorerkrankungen des blutbildenden Systems, insbesondere des multiplen Myeloms, zugelassen. Die genannten Wirkstoffe sind jedoch aufgrund ihres (pseudo)-irreversiblen Bindungsmodus nicht für die Behandlung solider Tumore geeignet. Dieses Problem könnte durch den Einsatz von  $\alpha$ -Ketophenylamiden überwunden werden, da diese Substanzklasse mit der Leitstruktur **BSc4999 (12)** nachweislich reversibel bindet. Eine weitere Besonderheit dieses Strukturmotivs ist die Tatsache, dass eine Adressierung der gestrichenen Seite der  $\beta 5$ -Untereinheit ermöglicht wird, was völlig neue Möglichkeiten liefert, um die Aktivität und die Selektivität der Substanzen zu optimieren. Die bereits in der Arbeitsgruppe *B. Schmidt* entwickelten  $\alpha$ -Ketophenylamide **BSc2189 (11)** und **BSc4999 (12)** zeigen zwar in Richtung der gestrichenen Seite des Substratbindekanals, wo sie allerdings keine Spezifitätstasche gezielt adressieren. Des Weiteren zeigen sie eine deutlich geringere zelluläre Aktivität als die zurzeit klinisch zugelassenen Inhibitoren, weshalb die genannten Strukturen als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen genutzt wurden.

Ausgehend von der Kokristallstruktur von **BSc4999 (12)** wurden mit Hilfe molekularer Modellierung Phenylether-Substituenten am Phenylamidterminus in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Position als vielversprechenden Ansatz identifiziert und die entsprechenden Verbindungen synthetisiert. Bei der anschließenden biochemischen Evaluierung zeigte sich, dass die *meta*-Substitution die stärkste Steigerung der inhibitorischen Aktivität aufweist, die durch die Wiedereinführung der Methylgruppen von **BSc4999 (12)** in der 4- und 6-Position noch weiter gesteigert werden konnte. Die anschließende Analyse eines Austauschs der *N*-terminalen Schutzgruppe identifizierte die 2,5-Dichlorbenzamid-Gruppe als weiteres potentes Strukturmotiv. Ein Austausch der Leucin-Seitenkette in P2 zeigte keine vorteilhaften Eigenschaften. Die gewonnen Erkenntnisse wurden anschließend kombiniert und führten zur Hybridstruktur **BSc5376 (143)** (siehe Abbildung 46), die als aktivste Struktur in MV4-11-Leukämiezellen identifiziert wurde. Bei dieser Struktur führt die *meta*-Phenylether-Substitution vermutlich zu einer vollständigen Besetzung der S1'-Tasche. Des Weiteren kommt es im Vergleich mit **BSc4999 (12)** und **BSc2189 (11)**, zu einer veränderten Lage der *N*-terminalen Gruppe, bei

denen die Cbz-Schutzgruppe in der S4-Tasche liegt. Bei **BSc5376 (143)** liegt die 2,5-Dichlorbenzamid-Gruppe vermutlich, durch eine Drehung von Leucin in P3 zum Solvens, in der S3-Tasche. Durch die im Vergleich zu Leucin größere Phenylamid-Gruppe werden drei Wassermoleküle verdrängt, was einen entropischen Vorteil liefert. Die Bestätigung dieser Theorie soll in Zukunft durch die Aufnahme einer Kokristallstruktur erfolgen.



**Abbildung 46:** Struktur des potentesten  $\alpha$ -Ketoamid-basierten Inhibitors **BSc5376 (143)** mit farblich hervorgehobenen Modifikationen (links) und die wahrscheinlichste simulierte Lage des Inhibitors in der  $\beta 5$ -Untereinheit des 20S-Proteasoms.

Bei der weiterführenden Evaluierung von **BSc5376 (143)** in verschiedenen Zelllinien wurde festgestellt, dass die zytotoxische Aktivität stark von der verwendeten Zelllinie abhängt. Während in MV4-11-Zellen der Epoxyketon-basierte, klinisch zugelassene Inhibitor **Carfilzomib (8)** die höchste zytotoxische Aktivität aufweist, ist **BSc5376 (143)** die potenteste Verbindung in Jurkat-Zellen. In THP-1-Zellen wird ein deutlicher Verlust der zytotoxischen Aktivität der Inhibitoren festgestellt, was auf eine vermehrte Expression des Immunoproteasoms zurückzuführen ist.

Die weitere Analyse der zeitabhängigen Inhibition der zellulären Proteasomaktivität sowie der zeitabhängigen Zytotoxizität unter Verwendung des Substrats **BSc5098 (146)** lieferte weitere Hinweise auf einen kovalent-reversiblen Bindemodus, sowie die Zellgängigkeit der Substanzen.

Die Evaluierung der Inhibitoren im *Danio rerio* Toxizitätsassay lieferte keinen Hinweis auf eine verminderte toxikologische Sicherheit der synthetisierten Substanzen. Im Zebrafisch-Embryonen-Fluchtrefflex-Assay zeigten die mit **BSc5376 (143)** behandelten Embryonen ein ähnliches Verhalten wie die Kontrollgruppe, wodurch auf eine deutlich selektivere Inhibition des Proteasoms geschlossen werden kann. Die mit **Bortezomib (4)** behandelten Embryonen zeigen hingegen starke neurologische Defizite, was vermutlich auf die Inhibition von nicht-Ziel-Proteasen, insbesondere Htra2/Omi, zurückzuführen ist. Dies ist ein beträchtlicher Nachteil von **Bortezomib (4)**, da das Auftreten der peripheren Neuropathie einen Dosis-limitierenden Faktor darstellt, der die Therapie der Patienten stark beeinflusst.

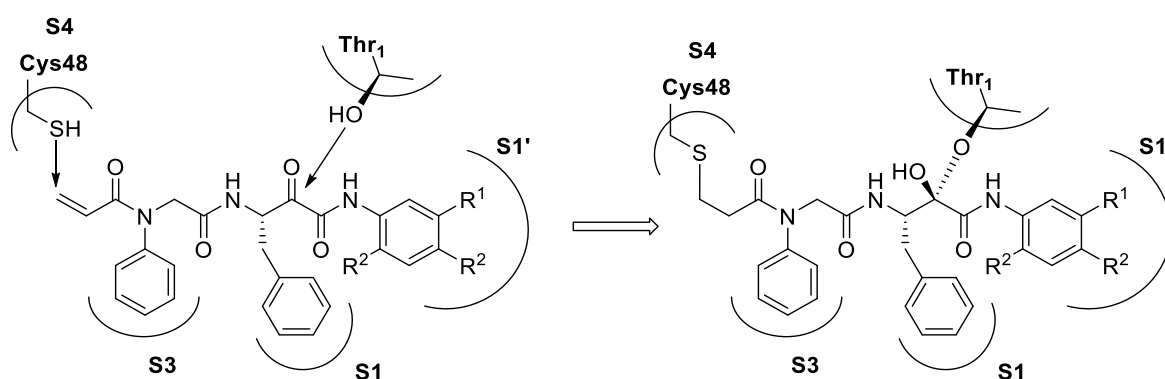
Die Lokalisierung der Proteasominhibitoren in MV4-11-Zellen wurde durch die Entwicklung der BODIPY-Konjugate **BSc5390 (151)** – **BSc5392 (153)** ermöglicht. Es kann eine vornehmliche Anreicherung der Substanzen im Zytoplasma unter Ausbildung von Aggresomen beobachtet werden, wobei auch eine Fluoreszenz im Zellkern zu beobachten ist. Bei der Inkubation von Zebrafisch-Embryonen mit den fluoreszenten Inhibitoren wird eine Anreicherung im Verdauungstrakt sowie dem Dottersack beobachtet, was auf eine Aufnahme in den Organismus hinweist.



Mit **BSc5376 (143)** konnte somit ein  $\beta 5$ -selektiver Proteasominhibitor entwickelt werden, der äußerst vielversprechende Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* aufweist und eine ebenso potente Inhibition durch kovalent-reversible Inhibitoren liefert, wie durch irreversible Inhibitoren.

#### 4.2. Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und pharmakologische Evaluation von dual-kovalenten Immunoproteasom-Inhibitoren

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wurde die Inhibition des Immunoproteasoms angestrebt, das als vielversprechendes Ziel für die Therapie von Autoimmunerkrankungen sowie ebenfalls von Tumoren angesehen wird und Gegenstand intensiver Forschung ist. Im vorliegenden Projekt sollte die Inhibition durch einen dual-kovalenten Ansatz erfolgen. Dieser basiert zunächst auf der kovalent-reversiblen Bindungsbildung mit Thr1 durch ein  $\alpha$ -Ketoamidmotiv, wodurch eine Vorzugsgeometrie für eine anschließende irreversible Bindungsknüpfung mit Cys48 durch ein Acrylamid begünstigt werden soll. Ausgehend von einem Patent der Merck KGaA wurden hierfür die Inhibitoren **BSc5429 (155)** – **BSc5434 (178)** computergestützt entwickelt und anschließend synthetisiert. Ein eingeführtes Phenylalanin in P1 sollte die Tatsache ausnutzen, dass im Immunoproteasom, im Vergleich zum konstitutiven Proteasom, die S1-Tasche deutlich vergrößert ist und somit zusätzliche Selektivität generiert werden kann. Des Weiteren wurde angestrebt die Molekülmasse der Inhibitoren zu senken, um die Ligandeneffizienz zu erhöhen und der Wechsel von peptidischen zu peptoiden Strukturen sollte die metabolische Stabilität verbessern. Der angestrebte Bindungsmodus ist in Schema 20 nochmals dargestellt.



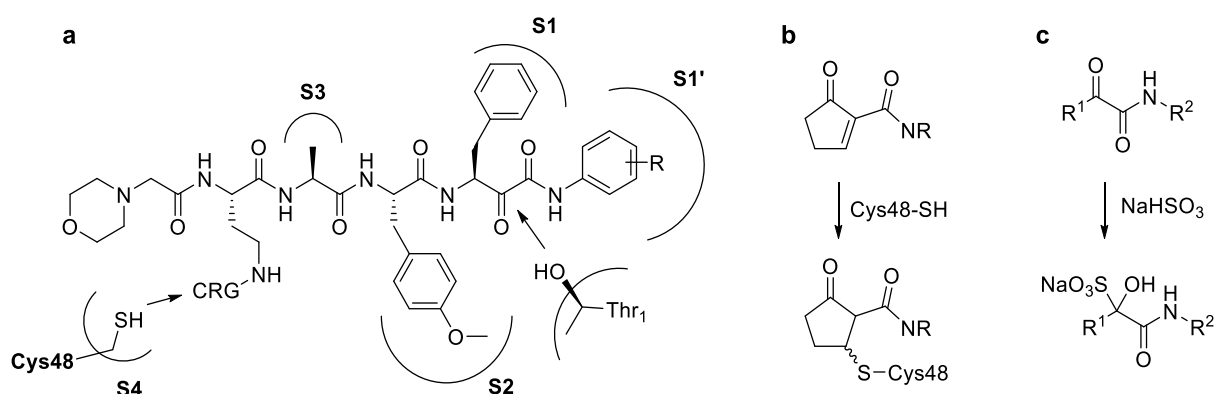
**Schema 20:** Schematische dual-kovalente Bindungsbildung in der  $\beta 5i$ -Untereinheit des Immuno-Proteasoms.

Bei der anschließenden Analyse der Inhibition von isoliertem iCP bei 100 nM Inhibitor-Konzentration zeigten sich zunächst positive Ergebnisse, die jedoch bei der folgenden Analyse bei einer Inhibitor-Konzentration von 1  $\mu$ M nicht bestätigt werden konnten. Vielmehr kam es zu einem kompletten Einbruch der inhibitorischen Aktivität der Substanzen. Es wird somit vermutet, dass es bei steigender Konzentration der Substanzen zu einer Mizellen-Bildung kommt, wodurch die Inhibition inaktiviert wird. Da durch die Ausgangssubstanz der Merck KGaA eine deutliche Inhibition des Immunoproteasoms ermittelt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass das  $\alpha$ -Ketoamid-Motiv in Kombination mit dem verkürzten peptoiden Rest die Mizellenbildung begünstigt. Somit sollte in folgenden Projekten das peptoides Rückgrat dahingehend modifiziert werden, dass eine Aggregation verhindert wird.

Eine Möglichkeit, wie dennoch eine dual kovalente Inhibierung erreicht werden kann, stellt eine Hybridstruktur aus **1-CA (19)** in Kombination mit **ONX0914 (18)** und **Bsc5376 (143)** dar.

Eine entsprechende Struktur ist in Schema 21 a dargestellt. Bei der vorgeschlagenen Struktur handelt es sich zwar erneut um eine peptidische Substanz, allerdings ist dadurch eine optimale Besetzung der Taschen innerhalb der  $\beta 5$ -Untereinheit des Immunoproteasoms möglich, wodurch eine deutliche Selektivität gegenüber der  $\beta 5c$ -Untereinheit erzielt werden kann. Von der Einführung der *N*-terminalen Morpholin-Gruppe wird ein positiver Effekt auf die Löslichkeit erhofft. Weiterhin wäre eine Einbeziehung der folgenden Punkte für die Entwicklung neuer Inhibitoren in Zukunft denkbar:

- Eine Variation der Aminosäurereste in P1, P2 und P3 sowie die Substitution der Phenoxy-Gruppe in P1' zur Entwicklung nicht-peptidischer Inhibitoren.
- Selektive Interaktionen in der S1'-Tasche mit Ser116 und Glu117 ( $\beta 5c$ ) beziehungsweise Glu116 und His117 ( $\beta 5i$ ) generieren um das Verhältnis der Inhibition von  $\beta 5c/\beta 5i$  zu variieren.
- Eine Variation der Cys48-reaktiven elektrophilen Gruppe könnte zu einer besseren Bindungsbildung führen. Hierfür könnten neben den in Abschnitt 3.3. erwähnten Motiven auch eine Cyclopentenon-Gruppe als Michael-Akzeptor genutzt werden (siehe Schema 21 b).
- Die Einführung von Löslichkeits-vermittelnden Gruppen, beispielsweise Morpholinen oder Stickstoff-Heteroaromaten sollte ebenfalls in Betracht gezogen werden.
- Eine Umsetzung der  $\alpha$ -Ketoamide zu den entsprechenden Bisulfit-Addukten könnte die Löslichkeit ebenfalls erhöhen (siehe Schema 21 c).<sup>[143]</sup> Die eventuell einhergehende Senkung der Aktivität könnte durch eine entsprechende gesteigerte Wasserlöslichkeit überkompensiert werden.



**Schema 21:** (a) Schematische dual-kovalente Bindungsbildung in der  $\beta 5i$ -Untereinheit des Immunoproteasoms durch die entworfene Hybridstruktur aus **ONX0914 (18)**, **1-CA (19)** und **BSc5376 (143)**, (b) schematische Michael-Addition von Cys48 an ein Cyclopentenon-Elektrophil und (c) schematische Reaktion zur Bildung von Bisulfit-Addukten.

#### 4.3. Synthese und pharmakologische Evaluation von Bisaminopyrimidinen als kovalent-bindende FLT-3 Inhibitoren

Im letzten Teil dieser Dissertation wurde sich mit der Synthese und der Evaluation der irreversibel bindenden Bisaminopyrimidin-basierten FLT3 Inhibitoren **BSc5300 (201)** – **BSc5312 (214)** beschäftigt. Da die übermäßig gesteigerte Aktivität der FLT3 Kinase, besonders in ihrer mutierten Form FLT3(D835Y), mit der akuten myeloischen Leukämie in Zusammenhang steht, ist deren Inhibition Gegenstand intensiver Forschung. Das Bisaminopyrimidin-Strukturmotiv wurde neben dem Indolinon-Strukturmotiv mit einer virtuellen *Screening*-Strategie, basierend auf einem Homologiemodell der FLT3-Kinase, bereits zuvor, als

---

vielversprechender Ansatz für die Entwicklung potenter, Cys828-irreversibel bindender Inhibitoren der FLT3-Kinase identifiziert.<sup>[120]</sup> Die Synthese der Amine **199** und **200** erfolgte ausgehend von Cyclopropylpyrazolylamin **196** in drei Stufen, die anschließend mit vier verschiedenen elektrophilen Gruppen divergent verknüpft wurden. Außerdem wurden auf diesem Weg die entsprechenden sterisch identischen, aber reversiblen Gruppen eingeführt. Bei der Evaluation der Substanzen zeigt sich, dass durch die reaktive Vinylsulfonamid-Gruppe von **BSc5311 (213)** und **BSc5312 (214)** eine Inhibition der FLT3(D835Y)- und der FLT3(ITD)-mutierten Kinase erzielt werden konnte, die auch deutlich stärker war als die Inhibition der entsprechenden reversiblen Derivate. Ebenfalls konnte eine starke Inhibition der Zellviabilität in der AML Zelllinie MV4-11 durch die Vinylsulfonamide beobachtet werden, die die inhibitorische Aktivität bekannter reversibler Inhibitoren übertrifft.

Bei der weiteren Evaluierung der potentesten Inhibitoren in MV4-11- (FLT3(ITD)), THP1- (FLT3*wt*), und Jurkat-Zellen (FLT3-negativ) wurde, im Gegensatz zum Indolinon-Derivat **BSc5371 (218)**, ebenfalls eine Inhibition der THP1- und Jurkat-Zellen durch **BSc5311 (213)** und **BSc5312 (214)** beobachtet, was auf einen promiscuen Wirkmechanismus durch eine synergistische Inhibition weiterer Kinasen hinweist. Dies konnte in einem Selektivitätspanel mit weiteren Kinasen, die ebenfalls das konservierte Cystein vor dem DFG-Motiv tragen, bestätigt werden. Neben einer hochpotenten Inhibition von FLT3(D835Y) werden auch die GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  potent inhibiert. Dies erklärt auch die hohen zytotoxischen Inhibitionswerte, da eine Inhibition von GSK3 $\alpha$  ebenfalls als Therapiestrategie der AML evaluiert wird und somit einen synergistischen Effekt neben der Inhibition der FLT3(D835Y) Kinase darstellt.<sup>[144]</sup>

Eine weitere Analyse von **BSc5311 (213)** in einem Western-Blot Assay konnte eine Inhibition der phosphorylierten Form der FLT3 Kinase und des *Downstream*-Effektors STAT5 bei niedrigen Inhibitor-Konzentrationen nachweisen.

Weiterhin zeigt **BSc5311 (213)** eine starke Zeit- und ATP-Abhängigkeit des Bindeverhaltens, was auf eine langsame Kinetik der Bindungsbildung schließen lässt. Durch den BODIPY-markierten, fluoreszenten, irreversiblen FLT3-Inhibitor **BSc5381 (219)**, konnten mittels Western-Blot Hinweise auf einen irreversiblen, kovalenten Bindungsmodus von **BSc5311 (213)** geliefert werden.

Insgesamt stellte sich aber heraus, dass für eine gezielte Inhibition der mutierten Kinase FLT3(D835Y) die Verwendung des Indolinon-basierten Vinylsulfonamids **BSc5371 (218)**, aufgrund dessen sehr hoher Selektivität und Aktivität, sinnvoller ist. Dennoch sollte das synergistische Inhibitionsverhalten der FLT3- sowie der GSK3-Kinase durch **BSc5311 (213)** weiter untersucht werden. Betrachtet man die Ligandeneffizienz in MV4-11-Zellen (-0.382), sowie den cLogP-Wert (3.07) so eignet sich das Bisaminopyrimidin Grundgerüst ebenfalls für weitere Modifikationen, um die Selektivität und die Aktivität zu verbessern.

Folgende Arbeiten sollten das Ziel verfolgen, die geringe Halbwertszeit der Vinylsulfonamid-basierten Inhibitoren gegenüber hohen Konzentrationen an Glutathion zu verbessern. Diese führen zu einer frühen Inaktivierung der Inhibitoren und einer entsprechend geringeren zellulären Aktivität. Hierfür sollten neue elektrophile Gruppen entwickelt und getestet werden, beispielsweise sollte die Verwendung der Cyclopentenon-Gruppe aus Abschnitt 4.2. in Betracht gezogen werden.

Die in der vorliegenden Dissertation vorgestellten Strategien ermöglichten die computer-gestützte Entwicklung von Proteasom- sowie FLT3-Inhibitoren in einem iterativen Verfahren

---

aus Modellierung, Synthese und Evaluation. Die Strategien sind im Grundsatz auf alle potenziellen Wirkstoffziele anwendbar und ermöglichen somit eine Zeit- und Kosten-reduzierte Wirkstoffentwicklung, die in ihrer Form auch außerhalb der industriellen Entwicklung Anwendung finden kann.

---

## 5. Experimenteller Teil

---

### 5.1. Molekulare Modellierung

#### 5.1.1. Strukturbasiertes Design von kovalent bindenden Proteasom-Inhibitoren

Für die molekulare Modellierung der Proteasominhibitoren wurde die Software *Molecular Operating Environment* (MOE, Version 2016.0802, Chemical Computing Group) verwendet. **BSc4999** in Komplex mit dem yCP wurde aus der *Protein Data Bank* (PDB: 4r02) bezogen und die  $\beta 6$ - (Kette L),  $\beta 5$ - (Kette K) und  $\beta 4$ -Untereinheiten (Kette J) mit den zugehörigen Liganden und Solvens isoliert und mit der *QuickPrep*-Funktion ohne *Refinement* der Struktur vorbereitet. Derivatisierung der Cbz-Schutzgruppe, Austausch der Aminosäure Leucin gegen Asp(OtBu) und Einführung der *ortho*-, *meta*- und *para*-Phenylether-Gruppe erfolgte ausgehend von der kokristallisierten Struktur von **BSc4999 (12)** und werden in der  $\beta 5$ -Tasche in ihrer Energie minimiert (Amber12:EHT-Kraftfeld). Für die Entwicklung der dual-kovalenten Inhibitoren des Immunoproteasoms wurde die Kristallstruktur von **1CA (19)** im Komplex mit dem yCP  $\beta 5$ -G48C (PDB: 5CGG) verwendet, modifiziert und ebenfalls energieminiert.

### 5.2. Organische Synthese

#### 5.2.1. Allgemeine Methoden und Messgeräte

##### 5.2.1.1. Lösungsmittel und Chemikalien

THF wurde zum Absolutieren unter Schutzgas mit Benzophenon als Indikator über Natrium mehrere Stunden zum Sieden erhitzt und anschließend unter Schutzgas destilliert. Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel wurden von *ABCR*, *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *BACHEM*, *Deutero GmbH*, *Fluka*, *Grüssing GmbH*, *Merck*, *Novabiochem*, *Carl Roth*, *Sigma-Aldrich*, *Carbolution Chemicals* und *VWR* bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Reaktionen unter Luft- und/oder Feuchtigkeitsausschluss wurden unter einer Atmosphäre aus Argon der Qualität 5.0 in vorher ausgeheizten Glasgeräten durchgeführt.

##### 5.2.1.2. Destillationen

Zum Entfernen von Lösungsmittel im Vakuum wurde ein Rotationsverdampfer mit angeschlossener Membranvakuumpumpe bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C verwendet.

##### 5.2.1.3. Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Für analytische Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigfolien der Firma *Merck* (*Kieselgel 60 F<sub>254</sub>*) mit Fluoreszenzindikator verwendet. Die Detektion erfolgte durch UV-Licht ( $\lambda = 254$  oder 360 nm). Die Laufmittelgemische sind als Volumenverhältnisse angegeben. Für weitere Detektionen wurden folgende Anfärbereagenzien verwendet:

- Ninhydrin-Reagenz: Lösung von 0.2 g Ninhydrin in 100 mL Ethanol;
- SEEBACH-Reagenz: Lösung von 1 g Cer(IV)-sulfat und 2.5 g Molybdätophosphorsäure in 94 mL Wasser und 6 mL konz. Schwefelsäure;
- $\text{KMnO}_4$ -Reagenz: Lösung von 2 g Kaliumpermanganat und 5 g Natriumcarbonat in 250 mL Wasser.

Die DC-Platten wurden in die jeweilige Lösung getaucht und durch Erhitzen mit einem Heißluftföhn entwickelt.

Flashchromatographie wurde unter Argondruck durchgeführt und es wurde Kieselgel der Firmen *Merck* (15 – 40  $\mu\text{m}$  Korngröße) oder *VWR* (40 – 63  $\mu\text{m}$  Korngröße) verwendet. Es wurden isokratische Laufmittel-Gradienten verwendet und die jeweiligen Laufmittelgemische sind als Volumenverhältnisse angegeben.

Automatisierte Flashchromatographie wurde mittels eines *Teledyne ISCO Combiflash R<sub>f</sub> 4x*-Systems mit UV-Diodenarraydetektor durchgeführt. Es wurden *SNAP*-Kartuschen (*KP-Sil 10 g/25 g/100 g*) der Firma *Biotage* bzw. Kartuschen (*Flash C18 4 g/12 g*) der Firma *TELOS* verwendet. Die Laufmittelgemische sind als Volumenverhältnisse vor der Mischung angegeben.

#### 5.2.1.4. NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten der Firma *Bruker BioSpin GmbH* bei 23 °C aufgenommen:

- Avance-II 300:  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz),  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz);
- Avance-III 300:  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz),  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz);
- Avance DRX 500:  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz),  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz),  $^{19}\text{F}$ -NMR (471 MHz),  $^{11}\text{B}$ -NMR (160 MHz), COSY, DEPT, HSQC, HMBC.

Für die  $^1\text{H}$ - bzw.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden die NMR-Signale der Probe auf das entsprechende Lösungsmittel referenziert (vgl. Tabelle 5.1).<sup>[145]</sup> Die chemischen Verschiebungen, angegeben in ppm, beziehen sich auf das Signal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels relativ zu Tetramethylsilan als Standard. Zur Auswertung der Spektren wurde die Software *MestReNova* der Firma *Mestrelab Research* verwendet.

Tabelle 5.1: Referenzwerte der chemischen Verschiebungen der verwendeten Lösungsmittel.

Lösemittel	Kern	$\delta/\text{ppm}$	Multiplizität
$\text{CDCl}_3$	$^1\text{H}$	7.26	s
	$^{13}\text{C}$	77.16	t
$\text{DMSO-}d_6$	$^1\text{H}$	2.50	quin
	$^{13}\text{C}$	39.52	sept
$\text{Methanol-}d_4$	$^1\text{H}$	3.31	quin
	$^{13}\text{C}$	49.00	sept

#### 5.2.1.5. Massenspektrometrie

ESI- und APCI-Massenspektren wurden auf einem *Impakt II qTOF* Massenspektrometer der Firma *Bruker Daltonik* aufgenommen.

---

#### 5.2.1.6. HPLC-Analytik

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde mittels eines *1100 Series Systems* der Firma *Agilent Technologies* durchgeführt. Es wurde eine *Synergi Polar reversed phase* Säule ( $4\text{ }\mu\text{m}$  Partikelgröße,  $150 \times 3.0\text{ mm}$ , Porengröße =  $80\text{ }\text{\AA}$ ) der Firma *Phenomenex* verwendet. Die Detektion erfolgte mittels eines Detektors mit variabler Wellenlänge. Als Laufmittel wurde ein Wasser/Acetonitril + 0.1% Trifluoressigsäure-Gemisch verwendet, wobei der verwendete lineare Gradient mit einer Flussrate von  $1\text{ mL/min}$  bei 30% Acetonitril (1 min) beginnt und anschließend über 10 min auf 90% Acetonitril ansteigt, wo er für 1 min gehalten wird. Die Detektion erfolgte bei 205 nm, 254 nm oder 360 nm.

#### 5.2.1.7. Mikrowellen-gestützte Synthese

Mikrowellen-gestützte Synthesen wurden in einem *Initiator Plus* Mikrowellenreaktor der Firma *Biotage* durchgeführt. Die jeweiligen Bedingungen sind den entsprechenden Experimenten zu entnehmen.

Alle Substanzen, die in einem biochemischen Assay verwendet wurden, haben eine Reinheit von mindestens 95%, die mittels HPLC bestimmt wurde (siehe Abschnitt 5.2.3.).

### 5.2.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### 5.2.2.1. Synthese von Diphenylethern via $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ (AAV1)

Zu einer Lösung des entsprechenden Fluornitrobenzols (1.0 eq.) und Phenol (1.0 eq.) in DMSO wird  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2.0 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung 24 h bei  $100\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionslösung auf RT abgekühlt, es wird Wasser zugegeben und dreimal mit MTBE extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt.

#### 5.2.2.2. Reduktion aromatischer Nitroverbindungen zu Aminen bzw. Cbz-Entschützung (AAV2)

Eine Lösung der zu reduzierenden Verbindung in MeOH wird zu 10 wt% 10% Pd/C gegeben. Die Suspension wird 24 h bei RT unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach vollständig abgelaufener Reaktion wird über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt.

#### 5.2.2.3. Synthese aromatischer Formamide (AAV3)

Das entsprechende aromatische Amin (1.0 eq.) wird in Toluol gelöst, Ameisensäure (2.0 eq.) wird zugegeben und die Reaktionsmischung 24 h zum Sieden erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionslösung mit AcOEt versetzt und die organische Phase mit 0.1 N aq. HCl, ges. aq.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und ges. aq. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt.

#### 5.2.2.4. Synthese aromatischer Isonitrile (AAV4)

Das entsprechende aromatische Formamid (1.0 eq.) wird in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst, mit  $\text{NEt}_3$  (10.0 eq.) versetzt und unter Schutzgas auf  $0\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Es wird langsam  $\text{POCl}_3$  (2.1 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 24 h bei RT gerührt. Wegen der Hydrolyselabilität von Isonitrilen muss die Aufarbeitung zügig und mit gekühlten Reagenzien erfolgen. Außerdem

---

sollten sämtliche Arbeiten wegen dem penetranten Geruch und der Toxizität von Isonitrilen in einem gut abgesaugten Abzug erfolgen. Nach vollständig abgelaufener Reaktion wird  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugegeben und mit ges. aq.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (2x) gewaschen. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{AcOEt}$ , 1:1). Die erhaltenen Isonitrile werden wegen ihrer schnellen Hydrolyse an der Luft direkt im nächsten Schritt eingesetzt.

#### 5.2.2.5. Synthese von $\alpha$ -Ketophenylamiden (AAV5)

Das entsprechende peptidische Aldehyd (1.0 eq.) und aromatische Isonitril (1.5 eq.) werden in einer möglichst geringen Menge  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und unter Schutzgas auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung von Trifluoressigsäure (2.0 eq.) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wird zugetropft und die Reaktionsmischung wird 2 h bei 0 °C und 24 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugegeben und die organische Phase mit 0.1 N aq. HCl (3x), ges. aq.  $\text{NaHCO}_3$  (3x) und ges. aq. NaCl-Lösung (1x) gewaschen. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Der erhaltene Feststoff wird in DMSO gelöst, mit IBX (2.0 eq.) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Reaktion wird  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugegeben und die Mischung wird mit Wasser (3x), ges. aq.  $\text{NaHCO}_3$  (3x) und ges. aq. NaCl-Lösung (1x) gewaschen. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{AcOEt}$ , 2:1).

#### 5.2.2.6. Nitrierung von Anilinen (AAV6)

Das entsprechende Anilin (1.0 eq.) wird in konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst und rauchende  $\text{HNO}_3$  (1.3 eq.) wird bei 0 °C zugetropft. Die Mischung wird auf RT erwärmt, für 12 h gerührt und anschließend auf Eis gegeben. Das Präzipitat wird abgefiltert, mit ges. aq.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen und mit AcOEt (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt.

#### 5.2.2.7. Arylierung von Phenolen via $\text{Ph}_2\text{ICl}$ (AAV7)

Kalium-*tert*-butanolat (1.1 eq.) wird in trockenem THF suspendiert, auf 0 °C gekühlt und das entsprechende Phenol (1.0 eq.) wird zugegeben. Die Suspension wird 15 min gerührt und anschließend wird  $\text{Ph}_2\text{ICl}$  (1.2 eq.) zugegeben und für 12 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird die Suspension auf 0 °C gekühlt und mit Wasser versetzt. Es wird mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert (3x), die vereinigten organischen Extrakte werden mit Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{AcOEt}$ , 100:1).

#### 5.2.2.8. Synthese von Phenolen aus Anilinen (AAV8)

Das entsprechende Anilinderivat (1.0 eq.) wird in Wasser suspendiert, auf 0 °C gekühlt und konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (13 mL) wird zugegeben. Natriumnitrit (1.3 eq.) wird in Wasser gelöst und zur Anilinsuspension gegeben. In einem weiteren Kolben wird eine Lösung aus 10 mL Wasser und 1.1 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zum Sieden erhitzt. Zu dieser Lösung wird die Anilinlösung langsam zugetropft und für 15 min zum Sieden erhitzt. Nach beendeter Reaktion wird das Reaktionsgemisch auf RT gekühlt und mit MTBE extrahiert (3x 35 mL). Die vereinigten organischen Extrakte werden mit einer 10%igen aq. NaOH-Lösung (3x 35 mL) extrahiert, die



---

vereinten wässrigen Extrakte werden mit aq. HCl angesäuert und erneut mit MTBE extrahiert (3x 35 mL). Die vereinigten organischen Extrakte werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Falls nötig, wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (°Hex/AcOEt).

#### 5.2.2.9. Peptidsynthese via HATU (AAV9)

Die entsprechende Carbonsäure (1.0 eq.) wird in DMF gelöst, HATU (1.1 eq.) wird zugegeben und die Mischung für 20 min bei RT gerührt. Das entsprechende Amin (1.0 eq.) und DIPEA (2.9 eq.) werden zugegeben und die Reaktionsmischung wird 24 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zugegeben und es wird mit 0.1 N aq. HCl (5x), 0.1 N aq. NaOH (3x) und ges. aq. NaCl-Lösung (1x) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt.

#### 5.2.2.10. Peptidsynthese via EDC und HOBt (AAV10)

Die entsprechende Carbonsäure (1.0 eq.) wird in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und EDC·HCl (1.0 eq.) und HOBt·H<sub>2</sub>O (1.2 eq.) werden zugegeben. Die Reaktionslösung wird 20 min bei RT gerührt bevor das entsprechende Amin (1.0 eq.) und NEt<sub>3</sub> (1.5 eq.) zugegeben werden und anschließend 24 bei RT gerührt. Nach vollständig abgelaufener Reaktion wird CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zugegeben und es wird mit 0.1 N aq. HCl (5x), 0.1 N aq. NaOH (3x) und ges. aq. NaCl-Lösung (1x) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt.

#### 5.2.2.11. Oxidationen von Alkoholen via IBX (AAV11)

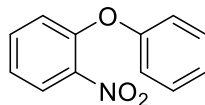
Der entsprechende peptidische Alkohol (1.0 eq.) wird in DMSO gelöst, IBX (1.5 eq.) zugegeben und 24 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zugegeben und mit Wasser (3x), ges. aq. NaHCO<sub>3</sub> (3x) und ges. aq. NaCl-Lösung (1x) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt.

### 5.2.3. Literaturbekannte Synthesen

Die Synthesen von Cbz-Leu-Leu-Leu-ol (**129**), Cbz-Leu-Leu-Leu-al **MG132** (**2**), Cbz-Leu-Asp(OtBu)-Leu-ol (**130**), Cbz-Leu-Asp(OtBu)-Leu-al **BSc2118** (**3**), 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl)essigsäure (**125**) und BODIPY-COOH (**147**) wurden analog zur Literatur durchgeführt. Die erhaltenen Spektren stimmen mit denen der Literatur überein. <sup>[51, 61, 134]</sup>

## 5.2.4. Darstellung der Inhibitoren für das konstitutive Proteasom

### 5.2.4.1. 2-Nitrodiphenylether (46)



Nach AAV1 werden 1-Fluor-2-nitrobenzol (748  $\mu$ L, 1.00 g, 7.08 mmol, 1.0 eq.), Phenol (666 mg, 7.08 mmol, 1.0 eq.) und  $K_2CO_3$  (1.96 g, 14.2 mmol, 2.0 eq.) in 15 mL DMSO bei 100 °C umgesetzt. 2-Nitrodiphenylether (**46**) wird als gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 1.96 g (14.2 mmol, 98%).

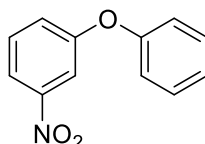
**Molmasse:**  $[C_{12}H_9NO_3]$ : 215.20 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.69 ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 5:1).

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ /ppm = 7.95 (dd,  $J$  = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 7.55 – 7.46 (m, 1H), 7.42 – 7.34 (m, 2H), 7.23 – 7.15 (m, 2H), 7.10 – 6.99 (m, 3H).

**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ /ppm = 155.9, 150.9, 134.2, 130.2, 125.9, 124.7, 123.2, 120.6, 119.4.

### 5.2.4.2. 3-Nitrodiphenylether (47)



Nach AAV1 werden 1-Fluor-3-nitrobenzol (1.51 mL, 2.00 g, 14.1 mmol, 1.0 eq.), Phenol (1.33 g, 14.1 mmol, 1.0 eq.) und  $K_2CO_3$  (3.92 g, 28.3 mmol, 2.0 eq.) in 15 mL DMSO bei 150 °C umgesetzt. 3-Nitrodiphenylether (**47**) wird als braunes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 2.96 g (13.7 mmol, 97%).

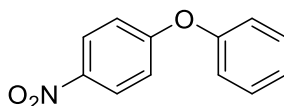
**Molmasse:**  $[C_{12}H_9NO_3]$ : 215.20 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.47 ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 5:1).

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ /ppm = 7.93 (ddd,  $J$  = 8.2, 2.2, 1.0 Hz, 1H), 7.79 (t,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 7.48 (t,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.45 – 7.37 (m, 2H), 7.32 (ddd,  $J$  = 8.3, 2.5, 1.0 Hz, 1H), 7.25 – 7.18 (m, 1H), 7.11 – 7.04 (m, 2H).

**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ /ppm = 158.7, 155.7, 149.5, 130.4, 130.4, 125.0, 124.3, 119.9, 117.8, 113.0.

#### 5.2.4.3. 4-Nitrodiphenylether (48)



Nach AAV1 werden 1-Fluor-4-nitrobenzol 748  $\mu$ L, 1.00 g, 7.08 mmol, 1.0 eq.), Phenol (666 mg, 7.08 mmol, 1.0 eq.) und  $K_2CO_3$  (1.96 g, 14.2 mmol, 2.0 eq.) in 15 mL DMSO bei 100 °C umgesetzt. 4-Nitrodiphenylether (48) wird als gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 1.45 g (6.72 mmol, 95%).

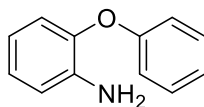
**Molmasse:**  $[C_{12}H_9NO_3]$ : 215.20 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.52 (°Hex/AcOEt = 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ /ppm = 8.24 – 8.18 (m, 2H), 7.48 – 7.41 (m, 2H), 7.28 – 7.25 (m, 1H), 7.12 – 7.08 (m, 2H), 7.04 – 7.00 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ /ppm = 163.5, 154.9, 142.8, 130.5, 126.1, 125.5, 120.7, 117.3.

#### 5.2.4.4. 2-Phenoxyanilin (49)



Nach AAV2 werden 2-Nitrodiphenylether (46) (2.90 g, 13.5 mmol, 1.0 eq.) und 10% Pd/C (290 mg, 10 wt%) in 40 mL MeOH umgesetzt. 2-Phenoxyanilin (49) wird als braunes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 2.35 g (12.7 mmol, 94%).

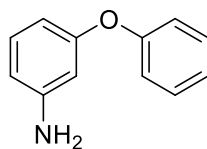
**Molmasse:**  $[C_{12}H_{11}NO]$ : 185.23 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.46 (°Hex/AcOEt = 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ /ppm = 7.34 – 7.29 (m, 2H), 7.06 (m, 1H), 7.02 – 6.97 (m, 3H), 6.89 (dd,  $J$  = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 6.84 (dd,  $J$  = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 6.76 – 6.71 (m, 1H), 3.69 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ /ppm = 157.6, 143.3, 138.7, 129.8, 125.0, 122.8, 120.4, 119.0, 117.3, 116.7.

#### 5.2.4.5. 3-Phenoxyanilin (50)



Nach AAV2 werden 3-Nitrodiphenylether (**47**) (2.82 g, 13.1 mmol, 1.0 eq.) und 10% Pd/C (282 mg, 10 wt%) in 100 mL MeOH umgesetzt. 3-Phenoxyanilin (**50**) wird als braunes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 2.44 g (12.1 mmol, quant.).

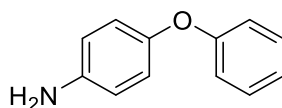
**Molmasse:** [C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO]: 185.23 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.20 (°Hex/AcOEt = 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.38 – 7.30 (m, 2H), 7.17 – 6.97 (m, 4H), 6.45 – 6.39 (m, 2H), 6.34 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.63 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 158.6, 157.3, 148.1, 130.5, 129.8, 123.3, 119.2, 110.2, 109.0, 105.7.

#### 5.2.4.6. 4-Phenoxyanilin (51)



Nach AAV2 werden 4-Nitrodiphenylether (**48**) (1.32 g, 6.15 mmol, 1.0 eq.) und 10% Pd/C (132 mg, 10 wt%) in 50 mL MeOH umgesetzt. 4-Phenoxyanilin (**51**) wird als brauner, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 976 mg (5.27 mmol, 86%).

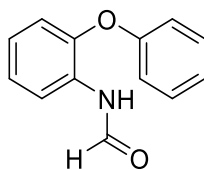
**Molmasse:** [C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO]: 185.23 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.14 (°Hex/AcOEt = 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.28 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.02 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.68 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.52 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 159.0, 148.8, 142.8, 129.7, 122.2, 121.2, 117.4, 116.4.

#### 5.2.4.7. *N*-(2-Phenoxyphenyl)formamid (52)



Nach AAV3 werden 2-Phenoxyanilin (**49**) (598 mg, 3.23 mmol, 1.0 eq.) und Ameisensäure (243  $\mu$ L, 297 mg, 6.46 mmol, 2.0 eq.) in 5 mL Toluol umgesetzt. *N*-(2-Phenoxyphenyl)formamid (**52**) wird als braunes Öl (1:1.5 Mischung von Rotameren) erhalten, das mit der Zeit kristallisiert.

**Ausbeute:** 629 mg (2.95 mmol, 91%).

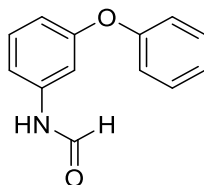
**Molmasse:** [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>]: 213.24 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.20 (c<sub>Hex</sub>/AcOEt = 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.76 – 8.80 (d,  $J$  = 11.5 Hz, 1H, H<sub>trans</sub>), 8.48 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, H<sub>cis</sub>), 8.44 (br s, 1H), 7.84 (br s, 1H), 7.29 – 7.39 (m, 2H), 6.85 – 7.17 (m, 6H) (1:1.5 Mischung von Rotameren).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 161.5, 159.0, 156.4, 145.5, 130.1, 124.7, 124.3, 124.1, 121.5, 118.6, 118.0 (1:1.5 Mischung von Rotameren).

#### 5.2.4.8. *N*-(3-Phenoxyphenyl)formamid (53)



Nach AAV3 werden 3-Phenoxyanilin (**50**) (765 mg, 4.13 mmol, 1.0 eq.) und Ameisensäure (309  $\mu$ L, 377 mg, 8.26 mmol, 2.0 eq.) in 5 mL Toluol umgesetzt. *N*-(3-Phenoxyphenyl)formamid (**53**) wird als braunes Öl (1:1 Mischung von Rotameren) erhalten, das mit der Zeit kristallisiert.

**Ausbeute:** 843 mg (3.95 mmol, 97%).

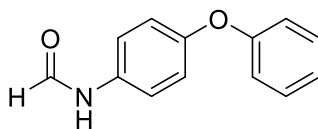
**Molmasse:** [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>]: 213.24 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.12 (c<sub>Hex</sub>/AcOEt = 3:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.62 – 8.66 (d,  $J$  = 11.2 Hz, 1H, H<sub>trans</sub>), 8.37 (m, 1H), 8.30 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H, H<sub>cis</sub>), 7.56 (br s, 1H), 6.71 – 7.37 ppm (m, 9H) (1:1 Mischung von Rotameren).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 162.6, 159.2, 158.9, 158.1, 156.8, 156.4, 138.3, 131.0, 130.3, 130.1, 129.9, 124.1, 123.7, 119.5, 119.3, 115.0, 114.8, 113.1, 110.6, 108.9 (1:1 Mischung von Rotameren).

#### 5.2.4.9. *N*-(4-Phenoxyphenyl)formamid (54)



Nach AAV3 werden 4-Phenoxyanilin (**51**) (942 mg, 5.08 mmol, 1.0 eq.) und Ameisensäure (384  $\mu$ L, 468 mg, 10.2 mmol, 2.0 eq.) in 5 mL Toluol umgesetzt. *N*-(4-Phenoxyphenyl)formamid (**54**) wird als braunes Öl (1:1 Mischung von Rotameren) erhalten.

**Ausbeute:** 998 mg (4.68 mmol, 92%).

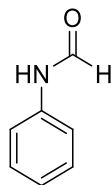
**Molmasse:** [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>]: 213.24 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.14 (°Hex/AcOEt = 3:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.58 – 8.62 (d,  $J$  = 11.5 Hz, 1H, H<sub>trans</sub>), 8.38 (br s, 1H), 8.35 ppm (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, H<sub>cis</sub>), 7.57 (br s, 1H), 7.49 – 7.52 (m, 1H), 7.30 – 7.37 (m, 2H), 6.97 – 7.02 (m, 4H) (1:1 Mischung von Rotameren).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 163.0, 159.1, 157.5, 157.2, 155.1, 154.1, 132.4, 132.1, 130.0, 129.9, 123.6, 123.3, 121.9, 121.2, 120.2, 119.7, 118.8, 118.7 (1:1 Mischung von Rotameren).

#### 5.2.4.10. *N*-Phenylformamid (221)



Nach AAV3 werden Anilin (**166**) (978  $\mu$ L, 1.00 g, 10.7 mmol, 1.0 eq.) und Ameisensäure (807  $\mu$ L, 985 mg, 21.4 mmol, 2.0 eq.) in 10 mL Toluol umgesetzt. *N*-Phenylformamid (**221**) wird als braunes Öl (Mischung von Rotameren) erhalten.

**Ausbeute:** 1.01 g (8.33 mmol, 78%).

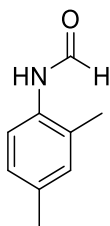
**Molmasse:** [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO]: 121.14 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.11 (°Hex/AcOEt = 3:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.70 (br s, 1H), 8.37 – 7.73 (m, 1H), 7.56 – 7.53 (m, 1H), 7.38 – 7.30 (m, 2H), 7.21 – 7.09 (m, 2H) (Mischung von Rotameren).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 162.7, 159.1, 137.0, 136.8, 129.9, 129.2, 125.4, 125.0, 120.1, 119.0 (Mischung von Rotameren).

#### 5.2.4.11. *N*-(2,4-Dimethylphenyl)formamid (**222**)



Nach AAV3 werden 2,4-Dimethylanilin (**84**) (1.03 mL, 1.00 g, 8.25 mmol, 1.0 eq.) und Ameisensäure (622  $\mu$ L, 759 mg, 16.5 mmol, 2.0 eq.) in 8 mL Toluol umgesetzt. *N*-(2,4-Dimethylphenyl)formamid (**222**) wird als brauner Feststoff (Mischung von Rotameren) erhalten.

**Ausbeute:** 1.03 g (6.90 mmol, 84%).

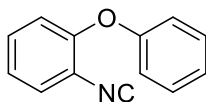
**Molmasse:** [C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO]: 149.19 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.13 (<sup>c</sup>Hex/AcOEt = 3:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.49 – 8.38 (m, 1H), 7.78 – 7.66 (m, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.01 (s, 2H), 2.30 (d, *J* = 10.4 Hz, 3H), 2.25 (d, *J* = 11.1 Hz, 3H) (Mischung von Rotameren).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 163.8, 159.5, 136.4, 135.7, 132.7, 132.3, 131.6, 130.3, 129.32, 128.0, 127.7, 123.7, 121.7, 21.2, 18.1, 18.0 (Mischung von Rotameren).

#### 5.2.4.12. Isocyano-2-phenoxybenzol (**55**)



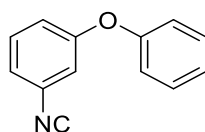
Nach AAV4 werden Formamid **52** (500 mg, 2.34 mmol, 1.0 eq.), POCl<sub>3</sub> (454  $\mu$ L, 753 mg, 4.91 mmol, 2.1 eq.) und Triethylamin (3.24 mL, 2.38 g, 23.4 mmol, 10.0 eq.) in 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Isocyano-2-phenoxybenzol (**55**) wird als gelbes Öl erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung im nächsten Schritt eingesetzt.

**Ausbeute:** 388 mg (1.98 mmol, 85%).

**Molmasse:** [C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>NO]: 195.22 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.73 (<sup>c</sup>Hex/AcOEt = 1:1).

#### 5.2.4.13. Isocyano-3-phenoxybenzol (56)



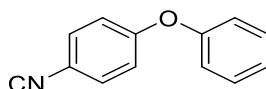
Nach AAV4 werden Formamid **53** (819 mg, 3.84 mmol, 1.0 eq.), POCl<sub>3</sub> (746 µL, 1.25 g, 8.06 mmol, 2.1 eq.) und Triethylamin (5.32 mL, 3.89 g, 38.4 mmol, 10.0 eq.) in 50 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Isocyano-3-phenoxybenzol (**56**) wird als gelbes Öl erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung im nächsten Schritt eingesetzt.

**Ausbeute:** 672 mg (3.44 mmol, 90%).

**Molmasse:** [C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>NO]: 195.22 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.70 (°Hex/AcOEt = 1:1).

#### 5.2.4.14. Isocyano-4-phenoxybenzol (57)



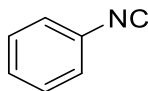
Nach AAV4 werden Formamid **54** (1.00 g, 4.69 mmol, 1.0 eq.), POCl<sub>3</sub> (921 µL, 1.53 g, 9.85 mmol, 2.1 eq.) und Triethylamin (6.50 mL, 4.75 g, 46.9 mmol, 10.0 eq.) in 50 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Isocyano-4-phenoxybenzol (**57**) wird als gelbes Öl erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung im nächsten Schritt eingesetzt.

**Ausbeute:** 782 mg (4.01 mmol, 85%).

**Molmasse:** [C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>NO]: 195.22 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.78 (°Hex/AcOEt = 1:1).

#### 5.2.4.15. Isocyanobenzol (223)



Nach AAV4 werden Formamid **221** (800 mg, 6.60 mmol, 1.0 eq.), POCl<sub>3</sub> (1.28 mL, 2.15 g, 13.9 mmol, 2.1 eq.) und Triethylamin (9.17 mL, 6.69 g, 66.0 mmol, 10.0 eq.) in 40 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Isocyanobenzol (**223**) wird als braunes Öl erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung im nächsten Schritt eingesetzt.

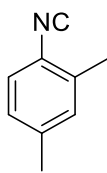
**Ausbeute:** 646 mg (6.27 mmol, 95%).

**Molmasse:** [C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N]: 103.12 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.83 (°Hex/AcOEt = 1:1).



#### 5.2.4.16. Isocyano-2,4-dimethylbenzol (141)



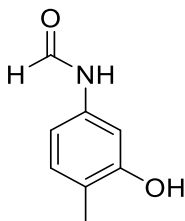
Nach AAV4 werden Formamid **222** (800 mg, 5.37 mmol, 1.0 eq.), POCl<sub>3</sub> (1.04 mL, 1.75 g, 11.3 mmol, 2.1 eq.) und Triethylamin (7.45 mL, 5.44 g, 53.7 mmol, 10.0 eq.) in 40 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Isocyano-2-phenoxybenzol (**141**) wird als gelbes Öl erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung im nächsten Schritt eingesetzt.

**Ausbeute:** 670 mg (5.10 mmol, 95%).

**Molmasse:** [C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N]: 131.18 g/mol.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.83 (°Hex/AcOEt = 1:1).

#### 5.2.4.17. *N*-(3-Hydroxy-4-methylphenyl)formamid (112)



5-Amino-2-methylphenol (**111**) (2.00 g, 16.2 mmol, 1.0 eq.) und Ameisensäure (920 µL, 1.12 g, 24.3 mmol, 1.5 eq.) werden in einem geschlossenen Mikrowellengefäß für 24 h bei 80 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird AcOEt (40 mL) zugegeben und die organische Phase wird mit ges. aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2 x 20 mL) und ges. aq. NaCl-Lösung (2 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. *N*-(3-Hydroxy-4-methylphenyl)formamid (**112**) wird als brauner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1.85 g (12.3 mmol, 76%).

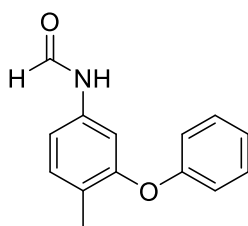
**Molmasse:** [C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>]: 151.17 g/mol.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.29 (°Hex/AcOEt = 1:2).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 9.92 (s, 1H), 9.41 – 9.25 (m, 1H), 8.19 – 8.17 (m, 1H), 7.23 – 7.19 (m, 1H), 6.98 – 6.93 (m, 1H), 6.84 – 6.81 (m, 1H), 2.05 (s, 3H) (1:1 Mischung von Rotameren).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 162.2, 159.1, 155.9, 155.3, 136.8, 131.0, 130.3, 119.5, 119.1, 109.7, 108.0, 106.0, 104.8, 15.4 (1:1 Mischung von Rotameren).

#### 5.2.4.18. *N*-(4-Methyl-3-phenoxyphenyl)formamid (**113**)



Nach AAV7 werden Formamid **112** (500 mg, 3.31 mmol, 1.0 eq.), *t*-BuOK (409 mg, 3.64 mmol, 1.1 eq.) und Ph<sub>2</sub>ICl (1.26 g, 3.97 mmol, 1.2 eq.) in 13 mL trockenem THF umgesetzt. Phenoxyphenylformamid **113** wird als braunes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 499 mg (2.20 mmol, 66%).

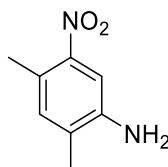
**Molmasse:** [C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>]: 227.26 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.21 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.55 (d, *J* = 11.4 Hz, 0.5H), 8.29 (d, *J* = 1.8 Hz, 0.5H), 7.72 – 7.65 (m, 0.5H), 7.36 – 7.27 (m, 2.5H), 7.20 (dd, *J* = 10.0, 8.2 Hz, 1H), 7.16 (s, 0.5H), 7.12 – 7.08 (m, 0.5H), 7.08 – 7.03 (m, 1H), 6.95 – 6.89 (m, 2H), 6.77 (dd, *J* = 8.1, 2.3 Hz, 0.5H), 6.59 (d, *J* = 2.2 Hz, 0.5H), 2.23 (s, 1.5H), 2.21 (s, 1.5H) (1:1 Mischung von Rotameren).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 162.3, 158.8, 157.6, 157.2, 155.8, 154.9, 135.9, 135.7, 132.5, 131.8, 130.0, 129.9, 126.9, 126.6, 123.3, 122.9, 118.0, 117.7, 115.7, 114.4, 111.6, 110.2, 15.8 (1:1 Mischung von Rotameren).

#### 5.2.4.19. 2,4-Dimethyl-5-nitroanilin (**86**)



Nach AAV6 werden 2,4-Dimethylanilin (**84**) (4.85 g, 40.0 mmol, 1.0 eq.) in 20 mL konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und rauchende Salpetersäure (2.40 mL, 3.20 g, 50.6 mmol, 1.3 eq.) umgesetzt. 2,4-Dimethyl-5-nitroanilin (**86**) wird als oranger Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 5.73 g (34.5 mmol, 86%).

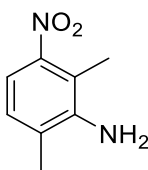
**Molmasse:** [C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]: 166.18 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.11 (°Hex/AcOEt = 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.33 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 2.18 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 143.4, 134.5, 128.7, 123.4, 116.5, 110.4, 19.9, 17.4.

#### 5.2.4.20. 2,6-Dimethyl-3-nitroanilin (87)



Nach AAV6 werden 2,6-Dimethylanilin (**85**) (4.85 g, 40.0 mmol, 1.0 eq.) in 20 mL konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und rauchende Salpetersäure (2.40 mL, 3.20 g, 50.6 mmol, 1.3 eq.) umgesetzt. 2,6-Dimethyl-3-nitroanilin (**87**) wird als gelber Feststoff erhalten.

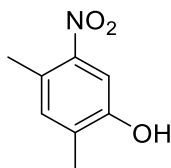
**Ausbeute:** 5.37 g (32.3 mmol, 81%).

**Molmasse:** [C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]: 166.18 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.17 (°Hex/AcOEt = 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.86 (br s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.23 (s, 3H).

#### 5.2.4.21. 2,4-Dimethyl-5-nitrophenol (90)



Nach AAV8 werden Nitroanilin **86** (2.85 g, 17.2 mmol, 1.0 eq.) und NaNO<sub>2</sub> (1.54 g, 22.3 mmol, 1.3 eq.) umgesetzt. Nitrophenol **90** wird als gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1.34 g (8.03 mmol, 47%).

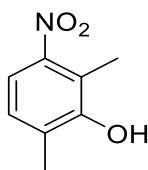
**Molmasse:** [C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>]: 167.16 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.26 (°Hex/AcOEt = 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 10.04 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 2.39 (s, 3H), 2.17 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 153.8, 146.3, 134.4, 131.5, 123.2, 109.7, 19.2, 15.7.

#### 5.2.4.22. 2,6-Dimethyl-3-nitrophenol (91)



Nach AAV8 werden Nitroanilin **87** (2.85 g, 17.2 mmol, 1.0 eq.) und NaNO<sub>2</sub> (1.54 g, 22.3 mmol, 1.3 eq.) umgesetzt. Nitrophenol **91** wird als gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1.53 g (9.15 mmol, 53%).

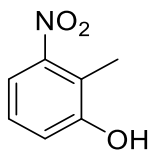
**Molmasse:** [C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>]: 167.16 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.18 (°Hex/AcOEt = 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 9.13 (s, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.25 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 154.0, 148.8, 130.6, 127.9, 119.4, 114.9, 17.0, 12.1.

#### 5.2.4.23. 2-Methyl-3-nitrophenol (92)



Nach AAV8 werden Nitroanilin **88** (3.62 g, 23.8 mmol, 1.0 eq.) und NaNO<sub>2</sub> (2.13 g, 31.0 mmol, 1.3 eq.) umgesetzt. Nitrophenol **92** wird als brauner Feststoff erhalten.

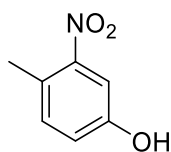
**Ausbeute:** 2.46 g (16.1 mmol, 67%).

**Molmasse:** [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>]: 153.14 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.35 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 10.29 (s, 1H), 7.30 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.22 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 2.22 (s, 3H).

#### 5.2.4.24. 4-Methyl-3-nitrophenol (**93**)



Nach AAV8 werden Nitroanilin **89** (3.62 g, 23.8 mmol, 1.0 eq.) und NaNO<sub>2</sub> (2.13 g, 31.0 mmol, 1.3 eq.) umgesetzt. Nitrophenol **93** wird als brauner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1.51 g (9.88 mmol, 42%).

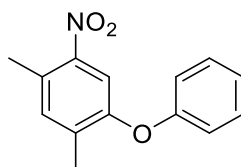
**Molmasse:** [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>]: 153.14 g/mol.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.36 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.48 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.01 (dd, *J* = 8.3, 2.7 Hz, 1H), 5.55 (s, 1H), 2.51 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 154.3, 149.4, 133.9, 125.9, 120.9, 111.6, 19.8.

#### 5.2.4.25. 1,5-Dimethyl-2-nitro-4-phenoxybenzol (**94**)



Nach AAV7 werden Nitrophenol **90** (500 mg, 2.99 mmol, 1.0 eq.), *t*-BuOK (369 mg, 3.29 mmol, 1.1 eq.) und Ph<sub>2</sub>ICl (1.14 g, 3.59 mmol, 1.2 eq.) in 13 mL trockenem THF umgesetzt. Phenoxybenzol **94** wird als gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 665 mg (2.73 mmol, 91%).

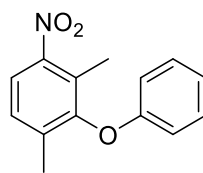
**Molmasse:** [C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>]: 243.26 g/mol.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.33 (°Hex/AcOEt = 50:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.52 (s, 1H), 7.38 – 7.33 (m, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.16 – 7.11 (m, 1H), 6.97 – 6.94 (m, 2H), 2.57 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 156.8, 153.5, 147.4, 136.1, 135.4, 130.2, 128.9, 123.9, 118.3, 114.9, 20.2, 16.4.

#### 5.2.4.26. 1,3-Dimethyl-4-nitro-2-phenoxybenzol (95)



Nach AAV7 werden Nitrophenol **91** (500 mg, 2.99 mmol, 1.0 eq.), *t*-BuOK (369 mg, 3.29 mmol, 1.1 eq.) und Ph<sub>2</sub>ICl (1.14 g, 3.59 mmol, 1.2 eq.) in 13 mL trockenem THF umgesetzt. Phenoxybenzol **95** wird als farbloser Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 605 mg (2.50 mmol, 83%).

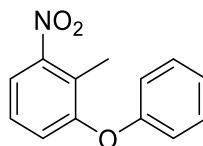
**Molmasse:** [C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>]: 243.26 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.19 (<sup>c</sup>Hex/AcOEt = 50:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.30 – 7.27 (m, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.05 – 7.01 (m, 1H), 6.76 – 6.72 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.20 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 157.2, 151.9, 149.3, 138.2, 130.1, 128.9, 128.1, 122.4, 121.4, 114.7, 17.2, 12.9.

#### 5.2.4.27. 2-Methyl-1-nitro-3-phenoxybenzol (96)



Nach AAV7 werden Nitrophenol **92** (500 mg, 3.26 mmol, 1.0 eq.), *t*-BuOK (403 mg, 3.59 mmol, 1.1 eq.) und Ph<sub>2</sub>ICl (1.24 g, 3.92 mmol, 1.2 eq.) in 13 mL trockenem THF umgesetzt. Phenoxybenzol **96** wird als gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 575 mg (2.51 mmol, 77%).

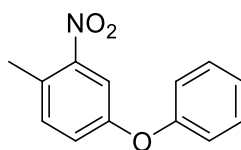
**Molmasse:** [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>]: 229.24 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.22 (<sup>c</sup>Hex/AcOEt = 50:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.63 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.38 – 7.34 (m, 2H), 7.28 – 7.24 (m, 1H), 7.16 – 7.12 (m, 1H), 7.10 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 6.96 – 6.93 (m, 2H), 2.46 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 157.0, 156.3, 151.5, 130.2, 127.0, 125.4, 123.9, 123.1, 119.4, 118.3, 12.2.

#### 5.2.4.28. 1-Methyl-2-nitro-4-phenoxybenzol (97)



Nach AAV7 werden Nitrophenol **93** (500 mg, 3.26 mmol, 1.0 eq.), *t*-BuOK (403 mg, 3.59 mmol, 1.1 eq.) und Ph<sub>2</sub>ICl (1.24 g, 3.92 mmol, 1.2 eq.) in 13 mL trockenem THF umgesetzt. Phenoxybenzol **97** wird als gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 614 mg (2.68 mmol, 82%).

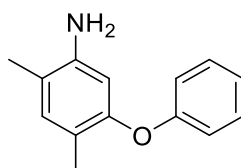
**Molmasse:** [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>]: 229.24 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.20 (°Hex/AcOEt = 50:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.58 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.40 – 7.36 (m, 2H), 7.29 – 7.27 (m, 1H), 7.20 – 7.14 (m, 2H), 7.05 – 7.02 (m, 2H), 2.56 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 156.3, 156.2, 149.8, 133.9, 130.3, 127.9, 124.6, 123.2, 119.5, 114.3, 19.9.

#### 5.2.4.29. 2,4-Dimethyl-5-phenoxyanilin (98)



Nach AAV2 werden Phenoxybenzol **94** (420 mg, 1.73 mmol, 1.0 eq.) und 10% Pd/C (42 mg, 10 wt%) in 40 mL MeOH umgesetzt. Phenoxyanilin **98** wird als farbloses Öl erhalten.

**Ausbeute:** 343 mg (1.61 mmol, 93%).

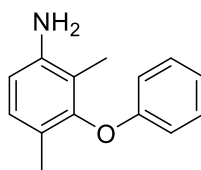
**Molmasse:** [C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>NO]: 213.28 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.10 (°Hex/AcOEt = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.30 – 7.26 (m, 2H), 7.03 – 6.99 (m, 1H), 6.92 – 6.88 (m, 3H), 6.30 (s, 1H), 3.65 – 3.30 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.09 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 158.7, 153.2, 143.7, 133.4, 129.9, 122.3, 120.0, 118.9, 117.3, 107.6, 17.1, 15.6.

#### 5.2.4.30. 2,4-Dimethyl-3-phenoxyanilin (**99**)



Nach AAV2 werden Phenoxybenzol **95** (593 mg, 2.44 mmol, 1.0 eq.) und 10% Pd/C (59 mg, 10 wt%) in 50 mL MeOH umgesetzt. Phenoxyanilin **99** wird als gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 472 mg (2.21 mmol, 91%).

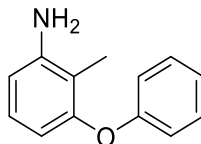
**Molmasse:** [C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>NO]: 213.28 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.14 (°Hex/AcOEt = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.26 – 7.22 (m, 2H), 6.97 – 6.93 (m, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.79 – 6.75 (m, 2H), 6.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.54 (br s, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.96 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 158.3, 151.4, 144.2, 129.7, 128.7, 121.3, 116.5, 114.9, 112.2, 16.0, 10.3.

#### 5.2.4.31. 2-Methyl-3-phenoxyanilin (**100**)



Nach AAV2 werden Phenoxybenzol **96** (563 mg, 2.46 mmol, 1.0 eq.) und 10% Pd/C (56 mg, 10 wt%) in 50 mL MeOH umgesetzt. Phenoxyanilin **100** wird als gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 462 mg (2.32 mmol, 94%).

**Molmasse:** [C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO]: 199.25 g/mol.

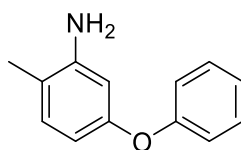
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.14 (°Hex/AcOEt = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.31 – 7.26 (m, 2H), 7.04 – 7.00 (m, 1H), 6.98 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.93 – 6.89 (m, 2H), 6.52 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 1H), 6.39 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 2.06 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 158.4, 155.0, 146.5, 129.7, 127.1, 122.2, 117.4, 114.7, 111.1, 110.5, 9.8.



#### 5.2.4.32. 2-Methyl-5-phenoxyanilin (101)



Nach AAV2 werden Phenoxybenzol **97** (822 mg, 3.58 mmol, 1.0 eq.) und 10% Pd/C (82 mg, 10 wt%) in 50 mL MeOH umgesetzt. Phenoxyanilin **101** wird als farbloser Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 699 mg (3.51 mmol, 98%).

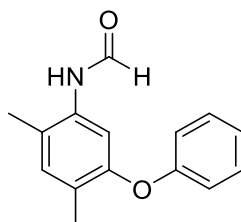
**Molmasse:** [C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO]: 199.25 g/mol.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.20 (°Hex/AcOEt = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.33 – 7.29 (m, 2H), 7.09 – 7.04 (m, 1H), 7.02 – 6.97 (m, 3H), 6.39 – 6.35 (m, 2H), 3.62 (s, 2H), 2.14 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 157.9, 156.4, 145.9, 131.4, 129.7, 122.9, 118.7, 117.5, 109.3, 105.8, 16.8.

#### 5.2.4.33. *N*-(2,4-Dimethyl-5-phenoxyphenyl)formamid (102)



Nach AAV3 werden Phenoxyanilin **98** (522 mg, 2.45 mmol, 1.0 eq.) und Ameisensäure (185 µL, 225 mg, 4.90 mmol, 2.0 eq.) in 5 mL Toluol umgesetzt. Phenoxyphenylformamid **102** wird als braunes Öl (1:1 Mischung von Rotameren) erhalten.

**Ausbeute:** 557 mg (2.31 mmol, 94%).

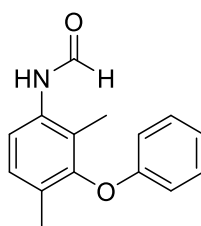
**Molmasse:** [C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>]: 241.29 g/mol.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.18 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.38 (d, *J* = 11.3 Hz, 0.5H), 8.36 (d, *J* = 1.8 Hz, 0.5H), 7.52 (s, 1H), 7.33 – 7.27 (m, 2H), 7.10 (s, 0.5H), 7.09 – 7.05 (m, 1H), 7.04 – 6.99 (m, 0.5H), 6.97 (s, 0.5H), 6.92 – 6.88 (m, 2H), 6.71 (s, 0.5H), 2.25 – 2.23 (m, 3H), 2.19 (s, 1.5H), 2.17 (s, 1.5H) (1:1 Mischung von Rotameren).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 163.0, 158.9, 158.0, 157.7, 153.3, 152.6, 133.9, 133.6, 133.1, 129.8, 127.8, 127.5, 125.0, 124.4, 122.9, 122.4, 117.4, 117.1, 115.2, 112.4, 17.3, 17.1, 15.9, 15.7 (1:1 Mischung von Rotameren).

#### 5.2.4.34. *N*-(2,4-Dimethyl-3-phenoxyphenyl)formamid (103)



Nach AAV3 werden Phenoxyanilin **99** (475 mg, 2.23 mmol, 1.0 eq.) und Ameisensäure (168  $\mu$ L, 205 mg, 4.45 mmol, 2.0 eq.) in 5 mL Toluol umgesetzt. Phenoxyphenylformamid **103** wird als brauner Feststoff (1:1 Mischung von Rotameren) erhalten.

**Ausbeute:** 530 mg (2.20 mmol, 99%).

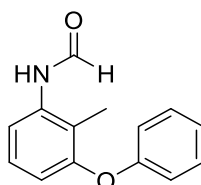
**Molmasse:** [C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>]: 241.29 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.21 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.51 (d,  $J$  = 11.3 Hz, 0.5H), 8.44 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 0.5H), 7.70 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 0.5H), 7.53 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 0.5H), 7.29 – 7.23 (m, 2H), 7.12 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.04 – 6.95 (m, 2H), 6.77 – 6.72 (m, 2H), 2.13 – 2.09 (m, 3H), 2.08 – 2.05 (m, 3H) (1:1 Mischung von Rotameren).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 163.2, 159.1, 157.9, 157.7, 151.9, 151.2, 134.4, 133.8, 129.9, 129.9, 129.2, 129.0, 124.4, 123.3, 121.9, 121.7, 120.4, 118.2, 114.8, 114.7, 16.4, 11.1, 11.0 (1:1 Mischung von Rotameren).

#### 5.2.4.35. *N*-(4-Methyl-3-phenoxyphenyl)formamid (104)



Nach AAV3 werden Phenoxyanilin **100** (456 mg, 2.29 mmol, 1.0 eq.) und Ameisensäure (173  $\mu$ L, 211 mg, 4.58 mmol, 2.0 eq.) in 5 mL Toluol umgesetzt. Phenoxyphenylformamid **104** wird als brauner Feststoff (1:1 Mischung von Rotameren) erhalten.

**Ausbeute:** 486 mg (2.14 mmol, 93%).

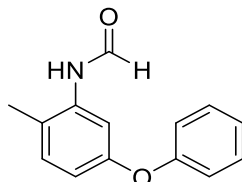
**Molmasse:** [C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>]: 227.26 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.20 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.59 (d,  $J$  = 11.2 Hz, 0.5H), 8.48 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 0.5H), 7.77 – 7.72 (m, 1H), 7.36 – 7.28 (m, 2H), 7.21 – 7.13 (m, 1H), 7.12 – 7.04 (m, 1H), 6.96 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 6.94 – 6.89 (m, 2H), 6.81 – 6.75 (m, 1H), 2.23 – 2.17 (m, 3H) (1:1 Mischung von Rotameren).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 163.2, 159.1, 157.5, 155.9, 155.0, 136.7, 136.2, 130.0, 129.9, 127.4, 127.2, 123.2, 122.9, 121.8, 121.2, 118.9, 118.0, 117.7, 117.0, 116.1, 10.6 (1:1 Mischung von Rotameren).

#### 5.2.4.36. *N*-(2-Methyl-5-phenoxyphenyl)formamid (105)



Nach AAV3 werden Phenoxyanilin **101** (685 mg, 3.44 mmol, 1.0 eq.) und Ameisensäure (259 µL, 316 mg, 6.88 mmol, 2.0 eq.) in 7 mL Toluol umgesetzt. Phenoxyphenylformamid **105** wird als brauner Feststoff (1:1 Mischung von Rotameren) erhalten.

**Ausbeute:** 724 mg (3.19 mmol, 93%).

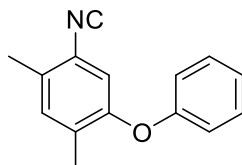
**Molmasse:** [C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>]: 227.26 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.22 (°Hex/AcOEt = 2:1).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.51 (d, *J* = 11.2 Hz, 0.5H), 8.42 (d, *J* = 1.8 Hz, 0.5H), 7.72 (d, *J* = 2.6 Hz, 0.5H), 7.69 – 7.62 (m, 0.5H), 7.38 – 7.28 (m, 2H), 7.19 – 6.97 (m, 4H), 6.85 – 6.73 (m, 2H), 2.27 – 2.24 (m, 3H) (1:1 Mischung von Rotameren).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 162.9, 158.9, 157.4, 157.0, 156.5, 155.9, 136.1, 135.8, 132.3, 131.4, 130.0, 129.8, 123.6, 123.3, 122.8, 119.1, 118.8, 116.0, 116.0, 113.8, 110.7, 17.1 (1:1 Mischung von Rotameren).

#### 5.2.4.37. 1-Isocyano-2,4-dimethyl-5-phenoxybenzol (106)



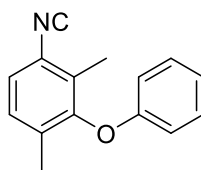
Nach AAV4 werden Formamid **102** (330 mg, 1.37 mmol, 1.0 eq.), POCl<sub>3</sub> (316 µL, 531 mg, 3.30 mmol, 2.1 eq.) und Triethylamin (1.90 mL, 1.37 g, 13.7 mmol, 10.0 eq.) in 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Isocyanobenzol **106** wird als gelbes Öl erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung im nächsten Schritt eingesetzt.

**Ausbeute:** 260 mg (1.16 mmol, 85%).

**Molmasse:** [C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NO]: 223.28 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.72 (°Hex/AcOEt = 1:1).

#### 5.2.4.38. 1-Isocyano-2,4-dimethyl-3-phenoxybenzol (107)



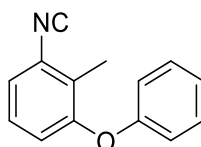
Nach AAV4 werden Formamid **103** (330 mg, 1.37 mmol, 1.0 eq.), POCl<sub>3</sub> (316 μL, 531 mg, 3.42 mmol, 2.1 eq.) und Triethylamin (1.90 mL, 1.37 g, 13.7 mmol, 10.0 eq.) in 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Isocyanobenzol **107** wird als grünes Öl erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung im nächsten Schritt eingesetzt.

**Ausbeute:** 282 mg (1.26 mmol, 92%).

**Molmasse:** [C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NO]: 223.28 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.68 (°Hex/AcOEt = 1:1).

#### 5.2.4.39. 1-Isocyano-2-methyl-3-phenoxybenzol (108)



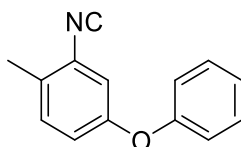
Nach AAV4 werden Formamid **104** (227 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.), POCl<sub>3</sub> (194 μL, 326 mg, 2.10 mmol, 2.1 eq.) und Triethylamin (1.38 mL, 1.01 g, 10.0 mmol, 10.0 eq.) in 15 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Isocyanobenzol **108** wird als gelbes Öl erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung im nächsten Schritt eingesetzt.

**Ausbeute:** 165 mg (0.789 mmol, 79%).

**Molmasse:** [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO]: 209.25 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.67 (°Hex/AcOEt = 1:1).

#### 5.2.4.40. 2-Isocyano-1-methyl-4-phenoxybenzol (109)



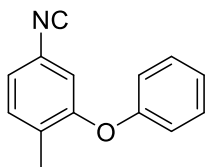
Nach AAV4 werden Formamid **105** (226 mg, 0.994 mmol, 1.0 eq.), POCl<sub>3</sub> (193 μL, 324 mg, 2.09 mmol, 2.1 eq.) und Triethylamin (1.38 mL, 1.01 g, 9.94 mmol, 10.0 eq.) in 15 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Isocyanobenzol **109** wird als gelbes Öl erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung im nächsten Schritt eingesetzt.

**Ausbeute:** 167 mg (0.798 mmol, 80%).

**Molmasse:** [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO]: 209.25 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.62 (°Hex/AcOEt = 1:1).

#### 5.2.4.41. 4-Isocyano-1-methyl-2-phenoxybenzol (110)



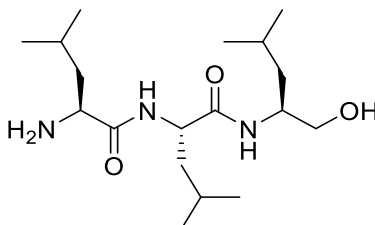
Nach AAV4 werden Formamid **113** (300 mg, 1.32 mmol, 1.0 eq.), POCl<sub>3</sub> (305 µL, 513 mg, 3.30 mmol, 2.1 eq.) und Triethylamin (1.83 mL, 1.36 g, 13.2 mmol, 10.0 eq.) in 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Isocyanobenzol **110** wird als grünes Öl erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung im nächsten Schritt eingesetzt.

**Ausbeute:** 238 mg (1.14 mmol, 86%).

**Molmasse:** [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO]: 209.25 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.68 (°Hex/AcOEt = 1:1).

#### 5.2.4.42. H<sub>2</sub>N-Leu-Leu-Leu-ol (131)



Nach AAV2 werden Cbz-Leu-Leu-Leu-ol (**129**) (1.01 g, 2.30 mmol, 1.0 eq.) und 10% Pd/C (101 mg, 10 wt%) in 50 mL MeOH umgesetzt. H<sub>2</sub>N-Leu-Leu-Leu-ol (**131**) wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 750 mg (2.18 mmol, 95%).

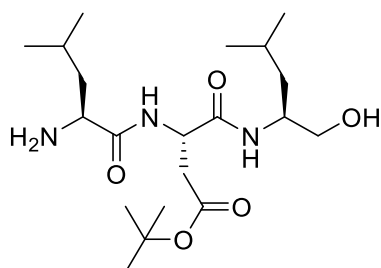
**Molmasse:** [C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]: 343.51 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.32 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.41 – 4.33 (m, 1H), 4.00 – 3.93 (m, 1H), 3.65 (dd, *J* = 11.1, 3.5 Hz, 1H), 3.53 (dd, *J* = 11.1, 5.6 Hz, 1H), 3.38 (dd, *J* = 9.8, 3.9 Hz, 1H), 1.76 – 1.53 (m, 6H), 1.42 – 1.29 (m, 4H), 0.97 – 0.86 (m, 18H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 176.4, 172.7, 66.0, 53.6, 51.8, 50.4, 44.1, 40.5, 40.1, 25.0, 23.5, 23.1, 22.4, 22.3, 21.5.

#### 5.2.4.43. H<sub>2</sub>N-Leu-Asp(O-*t*Bu)-Leu-ol (132)



Nach AAV2 werden Cbz-Leu-Asp(O*t*Bu)-Leu-ol (**130**) (1.00 g, 1.87 mmol, 1.0 eq.) und 10% Pd/C (100 mg, 10 wt%) in 50 mL MeOH umgesetzt. H<sub>2</sub>N-Leu-Asp(O*t*Bu)-Leu-ol (**132**) wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 716 mg (1.78 mmol, 95%).

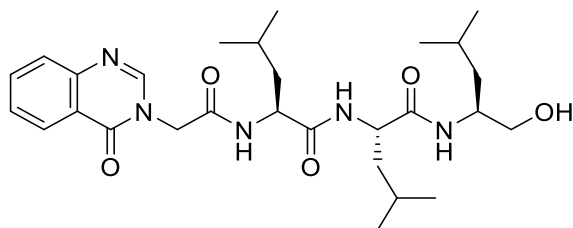
**Molmasse:** [C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 401.55 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.07 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 20:1).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.17 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.71 – 4.65 (m, 1H), 4.00 – 3.92 (m, 1H), 3.64 (dd, *J* = 11.2, 3.6 Hz, 1H), 3.50 – 3.45 (m, 1H), 3.39 (dd, *J* = 9.8, 4.0 Hz, 1H), 2.76 (dd, *J* = 16.6, 5.0 Hz, 1H), 2.67 (dd, *J* = 16.6, 7.2 Hz, 1H), 1.77 – 1.55 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.39 – 1.30 (m, 2H), 0.97 – 0.87 (m, 12H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 176.3, 171.2, 81.9, 65.8, 53.6, 50.6, 49.6, 44.2, 40.1, 37.3, 28.2, 25.0, 23.5, 23.2, 22.3, 21.5.

#### 5.2.4.44. (*S*)-*N*-((*S*)-1-Hydroxy-4-methylpentan-2-yl)-4-methyl-2-((*S*)-4-methyl-2-(2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl)acetamido)pentanamido)pentanamid (**133**)



Nach AAV9 werden 2-(4-Oxoquinazolin-3(4*H*)-yl)essigsäure **125** (94 mg, 0.460 mmol, 1.0 eq.), H<sub>2</sub>N-Leu-Leu-Leu-ol (**131**) (158 mg, 0.460 mmol, 1.0 eq.), HATU (192 mg, 0.506 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (227 μL, 172 mg, 1.33 mmol, 2.9 eq.) in 6 mL DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH = 20:1) gereinigt und Alkohol **133** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 161 mg (0.304 mmol, 66%).

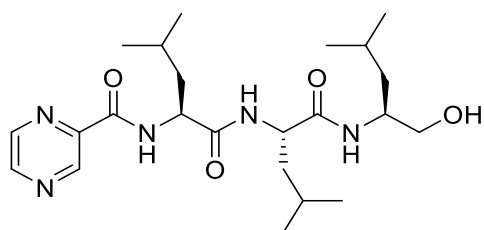
**Molmasse:** [C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>]: 529.68 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.16 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 8.58 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.12 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.84 (ddd, *J* = 8.5, 7.1, 1.6 Hz, 1H), 7.70 (dd, *J* = 8.2, 1.0 Hz, 1H), 7.56 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.2 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.50 (s, 1H), 4.34 – 4.28 (m, 1H), 4.25 – 4.19 (m, 1H), 3.77 – 3.68 (m, 1H), 3.28 – 3.24 (m, 1H), 3.17 – 3.10 (m, 1H), 1.68 – 1.61 (m, 1H), 1.61 – 1.55 (m, 1H), 1.52 – 1.42 (m, 5H), 1.28 – 1.21 (m, 1H), 1.18 – 1.11 (m, 1H), 0.91 – 0.87 (m, 6H), 0.86 – 0.83 (m, 6H), 0.76 – 0.74 (m, 3H), 0.73 – 0.71 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 171.3, 171.1, 166.7, 160.3, 148.5, 148.1, 134.4, 127.2, 127.0, 126.0, 121.4, 63.8, 51.4, 48.5, 48.2, 40.9, 40.5, 24.2, 24.1, 24.0, 23.3, 23.0, 22.9, 21.8, 21.6.

**5.2.4.45. *N*((*S*)-1-(((*S*)-1-(((*S*)-1-Hydroxy-4-methylpentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)pyrazin-2-carboxamid (**134**)**



Nach AAV9 werden Pyrazin-2-carbonsäure (**126**) (57 mg, 0.460 mmol, 1.0 eq.), H<sub>2</sub>N-Leu-Leu-Leu-ol (**131**) (158 mg, 0.460 mmol, 1.0 eq.), HATU (192 mg, 0.506 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (227 μL, 172 mg, 1.33 mmol, 2.9 eq.) in 6 mL DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH = 50:1) gereinigt und Alkohol **134** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 147 mg (0.324 mmol, 71%).

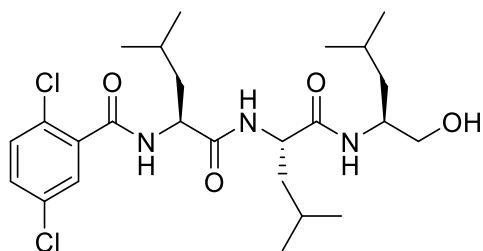
**Molmasse:** [C<sub>23</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>]: 449.60 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.24 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 9.38 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.78 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.56 – 8.53 (m, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.69 – 4.62 (m, 1H), 4.43 – 4.37 (m, 1H), 4.05 – 3.99 (m, 1H), 3.65 (dd, *J* = 11.1, 3.8 Hz, 1H), 3.56 (dd, *J* = 11.1, 5.6 Hz, 1H), 1.81 – 1.68 (m, 4H), 1.64 – 1.50 (m, 3H), 1.45 – 1.34 (m, 2H), 1.27 – 1.24 (m, 1H), 0.98 – 0.93 (m, 6H), 0.92 – 0.89 (m, 6H), 0.88 – 0.86 (m, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 172.13, 171.91, 163.58, 147.87, 144.61, 143.93, 142.90, 65.87, 52.56, 52.41, 50.38, 41.21, 40.75, 40.14, 25.08, 25.02, 23.22, 23.05, 22.94, 22.29, 22.19.

**5.2.4.46. 2,5-Dichlor-*N*((*S*)-1-(((*S*)-1-(((*S*)-1-hydroxy-4-methylpentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamid (135)**



Nach AAV10 werden 2,5-Dichlorbenzoesäure (**127**) (414 mg, 2.17 mmol, 1.0 eq.), H<sub>2</sub>N-Leu-Leu-Leu-ol (**131**) (744 mg, 2.17 mmol, 1.0 eq.), EDC x HCl (416 mg, 2.17 mmol, 1.0 eq.), HOBT x H<sub>2</sub>O (399 mg, 2.60 mmol, 1.2 eq.) und NEt<sub>3</sub> (451  $\mu$ L, 329 mg, 3.26 mmol, 1.5 eq.) in 30 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Alkohol **136** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 888 mg (1.72 mmol, 79%).

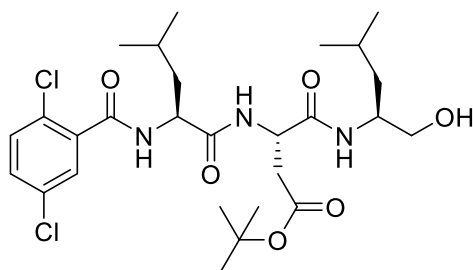
**Molmasse:** [C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]: 516.50 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.24 (°Hex/AcOEt = 1:2).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 7.49 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.59 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.76 – 4.69 (m, 1H), 4.54 – 4.45 (m, 1H), 4.01 – 3.93 (m, 1H), 3.66 – 3.59 (m, 1H), 3.55 – 3.49 (m, 1H), 2.84 (s, 1H), 1.78 – 1.54 (m, 6H), 1.42 – 1.24 (m, 3H), 0.99 – 0.85 (m, 18H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 172.1, 171.7, 165.6, 135.9, 133.4, 131.6, 131.5, 130.0, 129.2, 66.0, 52.9, 52.5, 50.3, 41.2, 41.0, 40.0, 25.1, 25.0, 23.2, 23.0, 22.4, 22.3.

**5.2.4.47. *tert*-Butyl(*S*)-3-((*S*)-2-(2,5-dichlorbenzamido)-4-methylpentanamido)-4-(((*S*)-1-hydroxy-4-methylpentan-2-yl)amino)-4-oxobutanoat (136)**



Nach AAV10 werden 2,5-Dichlorbenzoesäure (**127**) (327 mg, 1.71 mmol, 1.0 eq.), H<sub>2</sub>N-Leu-Asp(OtBu)-Leu-ol (**132**) (685 mg, 1.71 mmol, 1.0 eq.), EDC x HCl (328 mg, 1.71 mmol, 1.0 eq.), HOBT x H<sub>2</sub>O (314 mg, 2.05 mmol, 1.2 eq.) und NEt<sub>3</sub> (356  $\mu$ L, 260 mg, 2.57 mmol, 1.5 eq.) in 30 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Alkohol **136** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 721 mg (1.25 mmol, 73%).

**Molmasse:** [C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>]: 574.54 g/mol.

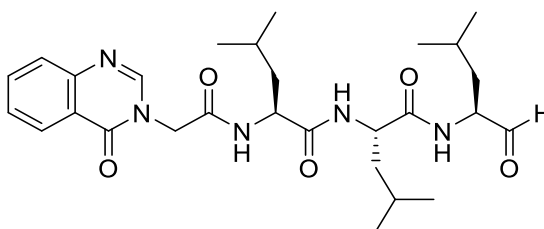
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.17 (°Hex/AcOEt = 5:1).



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.74 – 7.72 (m, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.36 – 7.35 (m, 2H), 6.78 – 6.72 (m, 2H), 4.70 – 4.63 (m, 1H), 4.57 – 4.50 (m, 1H), 4.05 – 3.98 (m, 1H), 3.67 – 3.62 (m, 1H), 3.53 – 3.47 (m, 1H), 2.99 (dd, *J* = 17.0, 4.1 Hz, 1H), 2.82 (s, 1H), 2.60 (dd, *J* = 17.0, 6.3 Hz, 1H), 1.79 – 1.77 (m, 4H), 1.70 – 1.65 (m, 1H), 1.61 – 1.54 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.02 – 0.97 (m, 6H), 0.89 – 0.83 (m, 6H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 171.9, 171.5, 170.4, 166.4, 135.6, 133.6, 131.9, 131.5, 130.4, 129.1, 82.4, 65.9, 53.9, 50.7, 50.2, 40.8, 39.9, 36.4, 28.1, 25.2, 24.8, 23.2, 22.1, 21.7.

**5.2.4.48. (*S*)-4-Methyl-*N*-(((*S*)-4-methyl-1-(((*S*)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)-2-(2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl)acetamido)pentanamid (137, BSc5372)**



Nach AAV11 werden Alkohol **133** (130 mg, 0.245 mmol, 1.0 eq.) und IBX (103 mg, 0.368 mmol, 1.5 eq.) in 6 mL DMSO umgesetzt. Aldehyd **137** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 109 mg (0.207 mmol, 84%).

**Molmasse:** [C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>]: 527.67 g/mol.

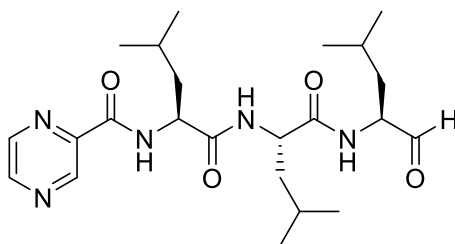
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.13 (°Hex/AcOEt = 1:5).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 9.32 (s, 1H), 8.61 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.11 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.84 (ddd, *J* = 8.5, 7.1, 1.6 Hz, 1H), 7.70 (dd, *J* = 8.2, 1.0 Hz, 1H), 7.56 (ddd, *J* = 8.1, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 4.36 – 4.26 (m, 2H), 4.04 – 3.98 (m, 1H), 1.69 – 1.58 (m, 2H), 1.57 – 1.41 (m, 6H), 1.36 – 1.29 (m, 1H), 0.91 – 0.89 (m, 6H), 0.87 – 0.84 (m, 6H), 0.80 – 0.78 (m, 3H), 0.75 – 0.73 (m, 3H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 201.2, 172.3, 171.4, 166.9, 160.3, 148.5, 148.1, 134.4, 127.2, 127.0, 125.9, 121.4, 56.4, 51.4, 51.1, 48.2, 40.8, 40.4, 36.2, 24.2, 24.1, 23.8, 23.0, 22.9, 22.8, 21.7, 21.1.

**MS (ESI):** *m/z* = 528.33 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.49. *N*((*S*)-4-Methyl-1-(((*S*)-4-methyl-1-(((*S*)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)pyrazin-2-carboxamid (138, BSc5374)**



Nach AAV11 werden Alkohol **134** (120 mg, 0.267 mmol, 1.0 eq.) und IBX (112 mg, 0.400 mmol, 1.5 eq.) in 6 mL DMSO umgesetzt. Aldehyd **138** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 107 mg (0.239 mmol, 90%).

**Molmasse:** [C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>]: 447.58 g/mol.

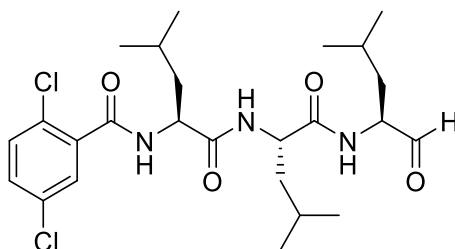
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.34 (°Hex/AcOEt = 1:5).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 9.54 (s, 1H), 9.37 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.77 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.55 – 8.53 (m, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.77 – 6.69 (m, 2H), 4.69 – 4.61 (m, 1H), 4.50 – 4.45 (m, 2H), 1.80 – 1.65 (m, 6H), 1.63 – 1.43 (m, 3H), 0.98 – 0.92 (m, 12H), 0.90 – 0.86 (m, 3H), 0.86 – 0.83 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 199.5, 172.0, 171.9, 163.5, 147.8, 144.6, 144.0, 142.9, 57.4, 52.2, 52.1, 41.1, 40.6, 37.9, 25.0, 24.9, 24.9, 23.2, 23.0, 22.9, 22.2, 22.0.

**MS (ESI):** *m/z* = 448.30 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.50. 2,5-Dichlor-*N*((*S*)-4-methyl-1-(((*S*)-4-methyl-1-(((*S*)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamid (139, BSc5373)**



Nach AAV11 werden Alkohol **135** (820 mg, 1.59 mmol, 1.0 eq.) und IBX (667 mg, 2.38 mmol, 1.5 eq.) in 20 mL DMSO umgesetzt. Aldehyd **139** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 722 mg (1.40 mmol, 88%).

**Molmasse:** [C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]: 514.49 g/mol.

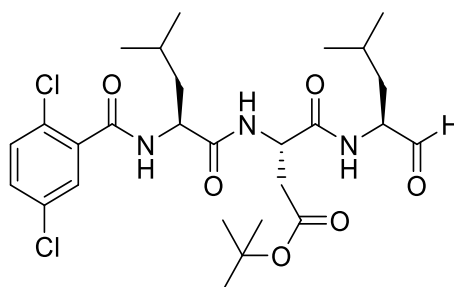
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.60 (°Hex/AcOEt = 1:2).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 9.50 (s, 1H), 7.47 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 7.15 – 7.10 (m, 2H), 7.01 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.82 – 4.73 (m, 1H), 4.67 – 4.59 (m, 1H), 4.39 – 4.32 (m, 1H), 1.78 – 1.54 (m, 8H), 1.44 – 1.37 (m, 1H), 0.98 – 0.85 (m, 18H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 199.6, 172.2, 171.7, 165.4, 136.1, 133.3, 131.5, 129.9, 129.3, 57.4, 52.6, 51.9, 41.4, 41.2, 37.6, 25.1, 25.0, 24.8, 23.2, 23.0, 22.9, 22.5, 21.9.

**MS (ESI):** *m/z* = 514.22 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.51. *tert*-Butyl ((*S*)-3-((*S*)-2-(2,5-dichlorbenzamido)-4-methylpentanamido)-4-(((*S*)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-oxobutanoat (140, BSc5380)**



Nach AAV11 werden Alkohol **136** (700 mg, 1.22 mmol, 1.0 eq.) und IBX (512 mg, 1.83 mmol, 1.5 eq.) in 8 mL DMSO umgesetzt. Aldehyd **140** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 537 mg (0.938 mmol, 77%).

**Molmasse:** [C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>]: 572.52 g/mol.

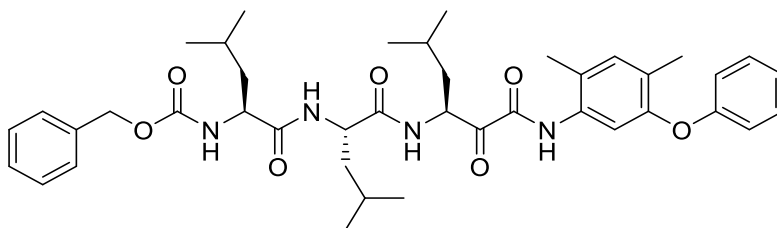
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.15 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 9.53 (s, 1H), 7.75 – 7.74 (m, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.37 – 7.36 (m, 2H), 7.18 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.84 – 4.78 (m, 1H), 4.59 – 4.54 (m, 1H), 4.44 – 4.39 (m, 1H), 3.05 (dd, *J* = 17.3, 3.9 Hz, 1H), 2.58 (dd, *J* = 17.2, 6.2 Hz, 1H), 1.87 – 1.75 (m, 2H), 1.72 – 1.59 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.03 – 0.99 (m, 6H), 0.91 – 0.89 (m, 3H), 0.86 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 199.9, 172.0, 171.2, 170.7, 166.2, 135.7, 133.6, 131.9, 131.6, 130.4, 129.0, 82.6, 57.6, 53.7, 49.6, 40.9, 37.5, 36.5, 28.2, 25.2, 24.7, 23.2, 21.7.

**MS (ESI):** *m/z* = 572.23 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.52. Benzyl((S)-1-(((S)-1-(((S)-1-((2,4-dimethyl-5-phenoxyphenyl)amino)-5-methyl-1,2-dioxohexan-3-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)carbamate (119, BSc5359)**



Nach AAV5 werden Cbz-Leu-Leu-Leu-al (**2**) (250 mg, 0.527 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **106** (176 mg, 0.788 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (81  $\mu$ L, 120 mg, 1.05 mmol, 2.0 eq.) und IBX (295 mg, 1.05 mmol, 2.0 eq.) umgesetzt. **BSc5359 (119)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 122 mg (0.171 mmol, 32%).

**Molmasse:** [C<sub>41</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>]: 714.90 g/mol.

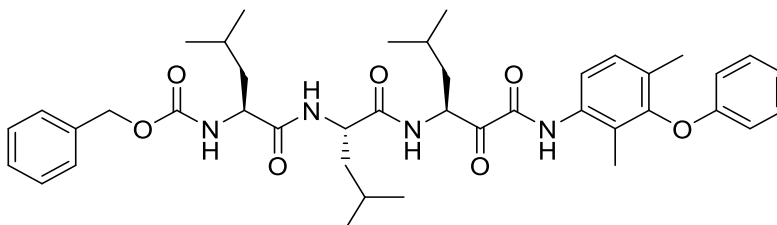
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.27 (<sup>o</sup>Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.58 – 8.54 (m, 1H), 7.75 – 7.71 (m, 1H), 7.37 – 7.24 (m, 7H), 7.09 – 7.05 (m, 1H), 7.03 – 6.99 (m, 1H), 6.94 – 6.76 (m, 3H), 6.45 – 6.36 (m, 1H), 5.36 – 5.29 (m, 1H), 5.21 – 5.14 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.54 – 4.42 (m, 1H), 4.19 – 4.12 (m, 1H), 2.29 – 2.21 (m, 3H), 2.18 – 2.14 (m, 3H), 1.80 – 1.55 (m, 6H), 1.55 – 1.44 (m, 3H), 1.02 – 0.84 (m, 18H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm 196.5, 172.3, 171.7, 171.5, 158.0, 156.4, 152.3, 136.0, 133.1, 132.8, 129.6, 128.6, 128.3, 128.1, 127.7, 124.2, 122.1, 116.6, 113.9, 67.4, 67.2, 54.1, 52.9, 51.5, 40.4, 40.2, 40.0, 39.9, 25.2, 24.7, 23.2, 22.9, 22.0, 21.9, 21.3, 16.8, 15.8.

**MS (ESI):** m/z = 715.41 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.53. Benzyl((S)-1-(((S)-1-(((S)-1-((2,4-dimethyl-3-phenoxyphenyl)amino)-5-methyl-1,2-dioxohexan-3-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)carbamate (120, BSc5360)**



Nach AAV5 werden Cbz-Leu-Leu-Leu-al (**2**) (343 mg, 0.721 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **107** (242 mg, 1.08 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (111  $\mu$ L, 164 mg, 1.44 mmol, 2.0 eq.) und IBX (404 mg, 1.44 mmol, 2.0 eq.) umgesetzt. **BSc5360 (120)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 168 mg (0.235 mmol, 33%).

**Molmasse:** [C<sub>41</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>]: 714.90 g/mol.

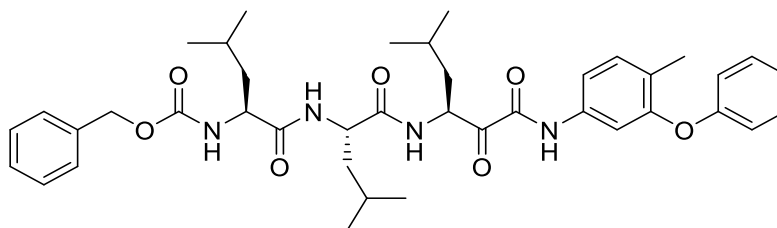
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.32 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.66 – 8.57 (m, 1H), 7.91 – 7.81 (m, 1H), 7.37 – 7.28 (m, 5H), 7.28 – 7.22 (m, 2H), 7.15 – 7.11 (m, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.88 – 6.83 (m, 1H), 6.75 – 6.71 (m, 2H), 6.51 – 6.42 (m, 1H), 5.45 – 5.37 (m, 1H), 5.25 – 5.18 (m, 1H), 5.14 – 5.06 (m, 2H), 4.56 – 4.45 (m, 1H), 4.23 – 4.13 (m, 1H), 2.12 – 2.03 (m, 6H), 1.82 – 1.57 (m, 6H), 1.57 – 1.48 (m, 3H), 1.04 – 0.99 (m, 3H), 0.92 (s, 15H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 196.8, 172.5, 171.7, 157.8, 156.9, 151.2, 136.2, 133.5, 129.9, 129.1, 128.7, 128.4, 128.2, 121.7, 118.9, 114.8, 67.6, 67.4, 54.3, 53.9, 53.0, 51.7, 51.5, 41.3, 40.6, 40.3, 25.4, 25.0, 24.9, 23.4, 23.1, 23.0, 22.2, 21.6, 16.5, 10.7.

**MS (ESI):** *m/z* = 715.41 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.54. Benzyl((*S*)-4-methyl-1-(((*S*)-4-methyl-1-(((*S*)-5-methyl-1-(4-methyl-3-phenoxyphenyl)amino)-1,2-dioxohexan-3-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)carbamate (121, BSc5358)**



Nach AAV5 werden Cbz-Leu-Leu-Leu-al (**2**) (250 mg, 0.526 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **108** (165 mg, 0.789 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (81 μL, 120 mg, 1.05 mmol, 2.0 eq.) und IBX (295 mg, 1.05 mmol, 2.0 eq.) umgesetzt. **BSc5358 (121)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 146 mg (0.208 mmol, 40%).

**Molmasse:** [C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>]: 700.88 g/mol.

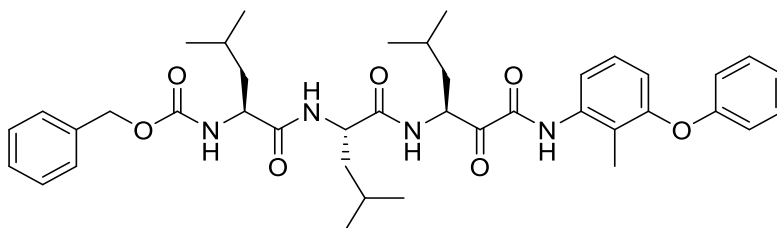
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.33 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.59 – 8.55 (m, 1H), 7.39 – 7.28 (m, 8H), 7.21 (dd, *J* = 8.2, 3.4 Hz, 1H), 7.18 – 7.16 (m, 1H), 7.08 – 7.03 (m, 1H), 6.92 – 6.88 (m, 2H), 6.78 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.48 – 6.41 (m, 1H), 5.36 – 5.30 (m, 1H), 5.24 – 5.16 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.53 – 4.42 (m, 1H), 4.21 – 4.14 (m, 1H), 2.23 – 2.19 (m, 3H), 1.78 – 1.55 (m, 6H), 1.54 – 1.44 (m, 3H), 1.01 – 0.84 (m, 18H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 196.6, 172.4, 171.7, 157.7, 156.7, 155.0, 135.3, 131.9, 129.9, 128.7, 128.4, 128.2, 127.3, 122.9, 117.6, 117.5, 115.6, 111.5, 67.6, 67.4, 52.9, 51.7, 41.3, 40.6, 40.5, 40.2, 40.0, 25.5, 25.4, 25.0, 24.9, 23.3, 23.1, 22.9, 22.2, 22.0, 21.5, 16.0.

**MS (ESI):** *m/z* = 701.39 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.55. Benzyl((S)-4-methyl-1-(((S)-4-methyl-1-(((S)-5-methyl-1-((2-methyl-3-phenoxyphenyl)amino)-1,2-dioxohexan-3-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)carbamate (122, BSc5357)**



Nach AAV5 werden Cbz-Leu-Leu-Leu-al (**2**) (250 mg, 0.526 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **109** (165 mg, 0.789 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (81  $\mu$ L, 120 mg, 1.05 mmol, 2.0 eq.) und IBX (295 mg, 1.05 mmol, 2.0 eq.) umgesetzt. **BSc5357 (122)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 152 mg (0.217 mmol, 41%).

**Molmasse:** [C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>]: 700.88 g/mol.

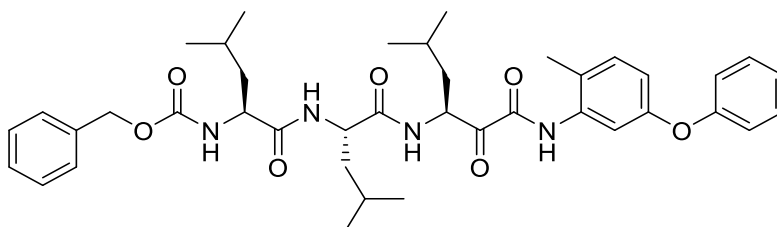
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.35 (<sup>o</sup>Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.73 – 8.67 (m, 1H), 7.91 – 7.84 (m, 1H), 7.36 – 7.27 (m, 7H), 7.21 – 7.16 (m, 1H), 7.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.00 – 6.97 (m, 1H), 6.92 – 6.87 (m, 2H), 6.80 – 6.76 (m, 1H), 6.61 – 6.51 (m, 1H), 5.45 – 5.38 (m, 1H), 5.34 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.14 – 5.06 (m, 2H), 4.57 – 4.50 (m, 1H), 4.22 – 4.14 (m, 1H), 2.22 – 2.15 (m, 3H), 1.83 – 1.58 (m, 6H), 1.58 – 1.47 (m, 3H), 1.01 (dt, *J* = 11.2, 6.2 Hz, 3H), 0.97 – 0.86 (m, 15H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 196.7, 172.6, 171.9, 171.8, 157.8, 156.9, 155.0, 135.8, 129.9, 128.7, 128.4, 128.2, 127.3, 122.9, 121.2, 117.7, 117.5, 117.2, 67.4, 54.2, 53.1, 53.0, 51.7, 51.5, 40.8, 40.2, 25.5, 25.4, 25.0, 24.9, 24.9, 23.3, 23.1, 22.2, 22.0, 21.6, 10.2.

**MS (ESI):** *m/z* = 701.40 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.56. Benzyl((S)-4-methyl-1-(((S)-4-methyl-1-(((S)-5-methyl-1-((2-methyl-5-phenoxyphenyl)amino)-1,2-dioxohexan-3-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)carbamate (123, BSc5356)**



Nach AAV5 werden Cbz-Leu-Leu-Leu-al (**2**) (250 mg, 0.526 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **110** (165 mg, 0.789 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (81  $\mu$ L, 120 mg, 1.05 mmol, 2.0 eq.)

und IBX (295 mg, 1.05 mmol, 2.0 eq.) umgesetzt. **BSc5356 (123)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 151 mg (0.215 mmol, 41%).

**Molmasse:** [C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>]: 700.88 g/mol.

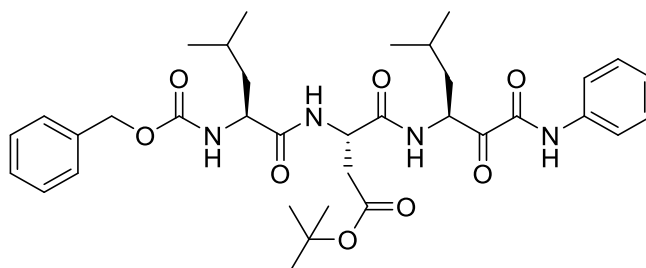
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.35 (Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.62 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.87 (dd, *J* = 7.4, 2.5 Hz, 1H), 7.37 – 7.28 (m, 7H), 7.15 – 7.11 (m, 1H), 7.10 – 7.06 (m, 1H), 7.00 – 6.97 (m, 2H), 6.88 – 6.83 (m, 1H), 6.77 – 6.72 (m, 1H), 6.49 – 6.44 (m, 1H), 5.38 – 5.32 (m, 1H), 5.24 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.13 – 5.06 (m, 2H), 4.55 – 4.43 (m, 1H), 4.20 – 4.12 (m, 1H), 2.28 (s, 1.5H), 2.24 (s, 1.5H), 1.81 – 1.57 (m, 6H), 1.57 – 1.45 (m, 3H), 1.00 – 0.97 (m, 3H), 0.96 – 0.85 (m, 15H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 196.6, 172.5, 171.9, 171.7, 157.5, 156.7, 155.9, 136.2, 136.1, 135.4, 131.5, 129.8, 128.7, 128.4, 128.2, 128.1, 123.3, 123.1, 118.6, 116.2, 112.7, 112.7, 67.4, 53.1, 53.0, 51.7, 51.5, 40.6, 40.2, 25.5, 25.4, 25.0, 24.9, 24.9, 23.3, 23.3, 23.1, 23.0, 23.0, 22.2, 22.1, 22.0, 21.6, 21.5, 17.0, 16.9.

**MS (ESI):** *m/z* = 701.40 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.57. *tert*-Butyl-((*S*)-3-((*S*)-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methylpentanamido)-4-(((*S*)-5-methyl-1,2-dioxo-1-(phenylamino)hexan-3-yl)amino)-4-oxobutanoat (74, BSc5327)**



Nach AAV5 werden Cbz-Leu-Asp(OtBu)-Leu-al (**3**) (265 mg, 0.497 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol (**223**) (77 mg, 0.746 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (77 μL, 113 mg, 0.994 mmol, 2.0 eq.) und IBX (278 mg, 0.994 mmol, 2.0 eq.) umgesetzt. **BSc5327 (74)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 133 mg (0.204 mmol, 41%).

**Molmasse:** [C<sub>35</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>]: 652.79 g/mol.

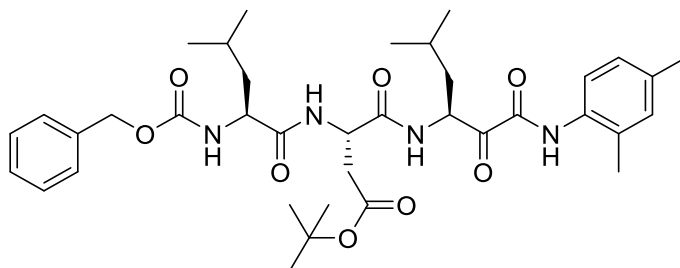
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.29 (Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.65 (s, 1H), 7.64 – 7.60 (m, 2H), 7.38 – 7.25 (m, 9H), 7.19 – 7.15 (m, 1H), 5.44 – 5.37 (m, 1H), 5.18 – 5.14 (m, 1H), 5.13 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H), 4.81 – 4.74 (m, 1H), 4.20 (s, 1H), 2.98 – 2.89 (m, 1H), 2.59 – 2.51 (m, 1H), 1.84 – 1.60 (m, 4H), 1.58 – 1.49 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.04 – 0.99 (m, 3H), 0.97 – 0.92 (m, 9H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 196.6, 172.2, 171.7, 170.5, 156.8, 136.4, 136.1, 129.3, 128.7, 128.5, 128.2, 125.5, 120.0, 82.2, 67.5, 54.2, 53.2, 49.3, 41.4, 40.2, 36.8, 28.2, 25.4, 25.0, 23.4, 23.1, 21.9, 21.5.

MS (ESI): m/z = 653.35 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.58. *tert*-Butyl-(*S*)-3-((*S*)-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methylpentanamido)-4-(((*S*)-1-((2,4-dimethylphenyl)amino)-5-methyl-1,2-dioxohexan-3-yl)amino)-4-oxobutanoat (75, BSc5328)**



Nach AAV5 werden Cbz-Leu-Asp(OtBu)-Leu-al (**3**) (196 mg, 0.367 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **141** (72 mg, 0.549 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (56 µL, 83 mg, 0.734 mmol, 2.0 eq.) und IBX (206 mg, 0.734 mmol, 2.0 eq.) umgesetzt. **BSc5328 (75)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 96 mg (0.141 mmol, 40%).

**Molmasse:** [C<sub>37</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>]: 680.84 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.33 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 50:1).

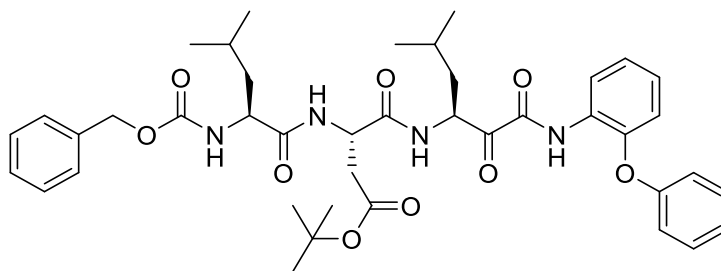
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 9.96 (s, 1H), 8.22 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.39 – 7.27 (m, 6H), 7.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.93 – 6.08 (m, 1H), 5.17 – 5.11 (m, 1H), 5.02 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 4.67 – 4.59 (m, 1H), 4.08 – 4.01 (m, 1H), 2.69 (dd, *J* = 16.1, 5.3 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.74 – 1.41 (m, 6H), 1.38 (s, 9H), 0.92 – 0.82 (m, 12H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 196.9, 172.1, 170.4, 169.1, 159.4, 155.9, 136.9, 135.5, 132.6, 132.0, 130.9, 127.7, 127.6, 126.5, 125.4, 80.2, 65.3, 53.1, 52.2, 49.1, 40.7, 38.4, 37.2, 27.6, 24.4, 24.1, 23.0, 22.9, 21.4, 21.1, 20.5, 17.5.

MS (ESI): m/z = 681.37 [M+H]<sup>+</sup>.



**5.2.4.59. *tert*-Butyl-(*S*)-3-((*S*)-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methylpentanamido)-4-(((*S*)-5-methyl-1,2-dioxo-1-((2-phenoxyphenyl)amino)hexan-3-yl)amino)-4-oxobutanoat (61, BSc5324)**



Nach AAV5 werden Cbz-Leu-Asp(OtBu)-Leu-al (**3**) (180 mg, 0.337 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **55** (209 mg, 0.506 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (53  $\mu$ L, 80 mg, 0.675 mmol, 2.0 eq.) und IBX (189 mg, 0.675 mmol, 2.0 eq.) umgesetzt. **BSc5324 (61)** wird nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH = 400:1) als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 28 mg (0.038 mmol, 11%).

**Molmasse:**  $[\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_9]$ : 744.89 g/mol.

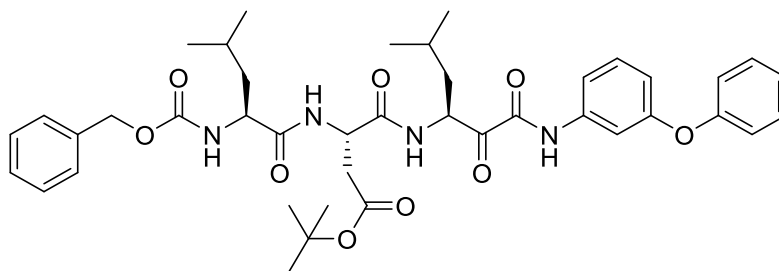
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.31 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  = 50:1).

**$^1\text{H}$ -NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 9.33 (s, 1H), 8.49 (dd,  $J$  = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 7.38 – 7.30 (m, 8H), 7.23 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.18 – 7.14 (m, 1H), 7.12 (td,  $J$  = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.07 (dd,  $J$  = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.05 – 7.02 (m, 2H), 6.86 (dd,  $J$  = 8.1, 1.5 Hz, 1H), 5.48 – 5.40 (m, 1H), 5.16 – 5.08 (m, 2H), 4.78 – 4.73 (m, 1H), 4.23 – 4.17 (m, 1H), 2.93 (d,  $J$  = 17.2 Hz, 1H), 2.58 – 2.50 (m, 1H), 1.80 – 1.60 (m, 6H), 1.58 – 1.45 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.03 – 0.99 (m, 3H), 0.98 – 0.90 (m, 9H).

**$^{13}\text{C}$ -NMR** (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 196.1, 172.1, 171.7, 170.4, 156.7, 156.2, 145.0, 136.1, 130.1, 128.7, 128.4, 128.2, 128.0, 125.4, 124.4, 123.9, 120.8, 119.2, 117.6, 82.2, 67.4, 54.1, 53.1, 49.2, 41.5, 40.3, 36.8, 28.1, 25.4, 25.0, 23.4, 23.1, 21.9, 21.5.

**MS (ESI):**  $m/z$  = 745.40  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**5.2.4.60. *tert*-Butyl-(*S*)-3-(((*S*)-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methylpentanamido)-4-(((*S*)-5-methyl-1,2-dioxo-1-((3-phenoxyphenyl)amino)hexan-3-yl)amino)-4-oxobutanoat (62, BSc5325)**



Nach AAV5 werden Cbz-Leu-Asp(OtBu)-Leu-al (**3**) (280 mg, 0.525 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **56** (154 mg, 0.787 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (81  $\mu$ L, 120 mg, 1.05 mmol, 2.0 eq.) und IBX (294 mg, 1.05 mmol, 2.0 eq.) umgesetzt. **BSc5325 (62)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 153 mg (0.205 mmol, 39%).

**Molmasse:** [C<sub>41</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>]: 744.89 g/mol.

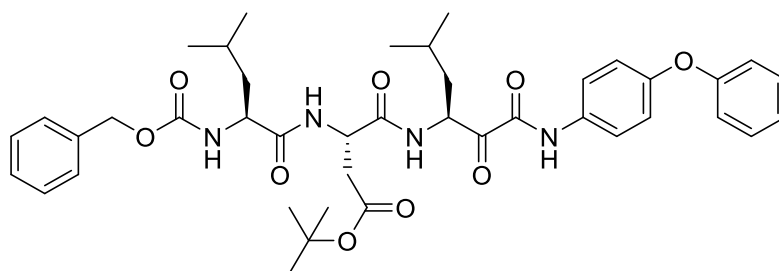
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.23 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.63 (s, 1H), 7.38 – 7.27 (m, 11H), 7.15 – 7.10 (m, 1H), 7.03 – 6.99 (m, 2H), 6.82 – 6.78 (m, 1H), 5.39 – 5.33 (m, 1H), 5.18 – 5.13 (m, 1H), 5.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 4.80 – 4.73 (m, 1H), 4.19 (s, 1H), 2.97 – 2.88 (m, 1H), 2.58 – 2.50 (m, 1H), 1.79 – 1.63 (m, 4H), 1.56 – 1.47 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.00 – 0.97 (m, 3H), 0.97 – 0.91 (m, 9H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 196.3, 172.0, 171.5, 170.3, 158.0, 156.7, 156.6, 137.6, 136.0, 130.2, 129.8, 128.6, 128.3, 128.1, 123.6, 119.1, 115.5, 114.6, 110.5, 82.0, 67.3, 54.0, 52.9, 49.1, 41.3, 39.9, 36.6, 28.0, 25.2, 24.8, 23.2, 23.0, 21.7, 21.4.

**MS (ESI):** *m/z* = 745.39 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.61. *tert*-Butyl-(*S*)-3-(((*S*)-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methylpentanamido)-4-(((*S*)-5-methyl-1,2-dioxo-1-((4-phenoxyphenyl)amino)hexan-3-yl)amino)-4-oxobutanoat (63, BSc5326)**



Nach AAV5 werden Cbz-Leu-Asp(OtBu)-Leu-al (**3**) (280 mg, 0.525 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **57** (154 mg, 0.787 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (81  $\mu$ L, 120 mg,

1.05 mmol, 2.0 eq.) und IBX (294 mg, 1.05 mmol, 2.0 eq.) umgesetzt. **BSc5326 (63)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 130 mg (0.175 mmol, 33%).

**Molmasse:** [C<sub>41</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>]: 744.89 g/mol.

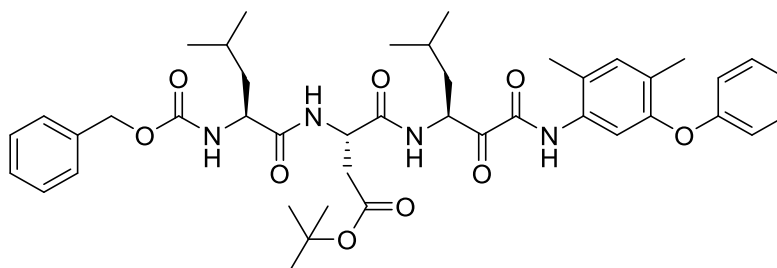
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.29 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.65 (s, 1H), 7.62 – 7.56 (m, 2H), 7.41 – 7.26 (m, 9H), 7.13 – 7.08 (m, 1H), 7.02 – 6.97 (m, 4H), 5.43 – 5.37 (m, 1H), 5.19 – 5.14 (m, 1H), 5.13 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H), 4.80 – 4.75 (m, 1H), 4.21 (s, 1H), 2.94 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H), 2.60 – 2.52 (m, 1H), 1.82 – 1.61 (m, 4H), 1.56 – 1.49 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.03 – 0.99 (m, 3H), 0.97 – 0.92 (m, 9H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 196.6, 172.2, 171.7, 170.5, 157.4, 156.7, 154.6, 136.1, 131.8, 129.9, 128.7, 128.5, 128.2, 123.5, 121.6, 119.7, 118.8, 82.2, 67.5, 54.2, 53.2, 49.3, 41.4, 40.2, 36.8, 28.2, 25.4, 25.0, 23.4, 23.1, 21.9, 21.5.

**MS (ESI):** *m/z* = 745.39 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.62. *tert*-Butyl(5)-3-((5)-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methylpentanamido)-4-(((5)-1-((2,4-dimethyl-5-phenoxyphenyl)amino)-5-methyl-1,2-dioxohexan-3-yl)amino)-4-oxobutanoate (124, BSc5377)**



Nach AAV5 werden Cbz-Leu-Asp(OtBu)-Leu-al (**3**) (250 mg, 0.468 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **106** (157 mg, 0.702 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (72 μL, 107 mg, 0.936 mmol, 2.0 eq.) und IBX (262 mg, 0.936 mmol, 2.0 eq.) umgesetzt. **BSc5377 (124)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 207 mg (0.263 mmol, 56%).

**Molmasse:** [C<sub>43</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>]: 772.94 g/mol.

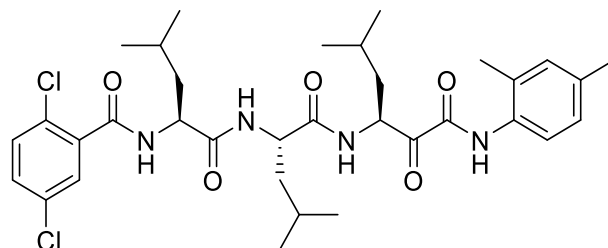
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.27 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.61 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.36 – 7.31 (m, 5H), 7.30 – 7.25 (m, 3H), 7.08 (s, 1H), 7.03 – 6.99 (m, 1H), 6.89 – 6.86 (m, 2H), 5.42 – 5.35 (m, 1H), 5.32 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.82 – 4.75 (m, 1H), 4.24 – 4.19 (m, 1H), 2.95 – 2.87 (m, 1H), 2.61 – 2.52 (m, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.80 – 1.64 (m, 4H), 1.58 – 1.49 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.00 – 0.97 (m, 3H), 0.96 – 0.92 (m, 9H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 196.6, 172.2, 171.5, 170.3, 158.1, 156.4, 152.3, 136.1, 133.2, 133.0, 129.7, 128.6, 128.3, 128.1, 127.7, 124.2, 122.2, 116.6, 114.0, 82.0, 67.3, 54.1, 53.0, 49.2, 41.3, 40.0, 36.7, 28.1, 25.3, 24.9, 23.3, 23.0, 21.8, 21.4, 16.9, 15.8.

MS (ESI): m/z = 773.41 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.63. 2,5-Dichlor-*N*((*S*)-1-(((*S*)-1-(((*S*)-1-((2,4-dimethylphenyl)amino)-5-methyl-1,2-dioxohexan-3-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamid (142, BSc5375)**



Nach AAV5 werden Aldehyd **139** (425 mg, 0.826 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **141** (163 mg, 1.24 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (127 µL, 188 mg, 1.65 mmol, 2.0 eq.) in 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und IBX (462 mg, 1.65 mmol, 2.0 eq.) in 5 mL DMSO umgesetzt. **BSc5375 (142)** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 184 mg (0.268 mmol, 17%).

**Molmasse:** [C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>]: 661.67 g/mol.

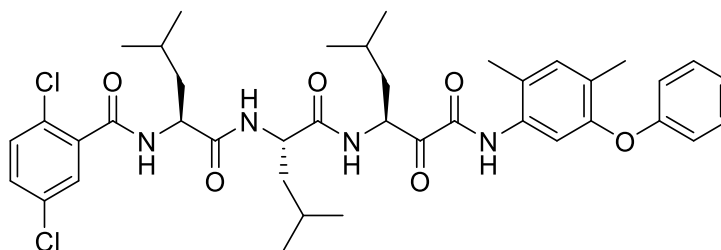
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.32 (°Hex/AcOEt = 2:1).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm 9.95 (s, 1H), 8.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.53 (s, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.16 – 5.07 (m, 1H), 4.51 – 4.40 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.75 – 1.62 (m, 3H), 1.61 – 1.43 (m, 6H), 0.96 – 0.83 (m, 18H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 197.1, 172.0, 171.1, 164.8, 159.6, 138.0, 135.4, 132.5, 132.0, 131.4, 131.3, 130.8, 130.5, 128.7, 128.5, 126.5, 125.3, 52.1, 51.7, 50.5, 41.0, 39.9, 38.2, 24.5, 24.2, 24.0, 23.0, 23.0, 21.7, 21.5, 21.0, 20.5, 17.5.

MS (ESI): m/z = 661.30 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.64. 2,5-Dichlor-*N*((*S*)-1-(((*S*)-1-(((*S*)-1-((2,4-dimethyl-5-phenoxyphenyl)amino)-5-methyl-1,2-dioxohexan-3-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamid (143, BSc5376)**



Nach AAV5 werden Aldehyd **139** (294 mg, 0.572 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **106** (200 mg, 0.857 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (88  $\mu$ L, 130 mg, 1.14 mmol, 2.0 eq.) in 8 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und IBX (319 mg, 1.14 mmol, 2.0 eq.) in 5 mL DMSO umgesetzt. **BSc5376 (143)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 136 mg (0.180 mmol, 31%).

**Molmasse:** [C<sub>40</sub>H<sub>50</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>]: 753.76 g/mol.

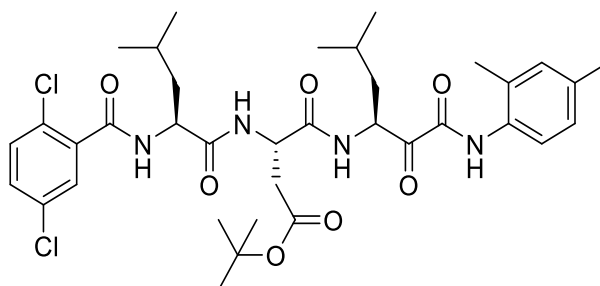
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.33 (Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.56 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.50 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.30 – 7.26 (m, 5H), 7.08 (s, 1H), 7.03 – 6.99 (m, 2H), 6.96 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.89 – 6.86 (m, 2H), 5.32 – 5.26 (m, 1H), 4.79 – 4.72 (m, 1H), 4.63 – 4.56 (m, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.77 – 1.60 (m, 7H), 1.58 – 1.50 (m, 1H), 1.49 – 1.41 (m, 1H), 0.98 – 0.87 (m, 18H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 196.7, 165.4, 158.1, 156.6, 152.5, 136.0, 133.3, 133.2, 133.0, 131.5, 130.1, 129.8, 129.2, 127.9, 124.4, 122.3, 116.8, 114.1, 53.1, 52.6, 51.7, 41.3, 41.1, 40.1, 25.4, 25.0, 24.9, 23.3, 23.0, 22.9, 22.4, 22.4, 21.5, 17.0, 15.9.

**MS (ESI):** *m/z* = 753.33 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.65. *tert*-Butyl (*S*)-3-((*S*)-2-(2,5-dichlorbenzamido)-4-methylpentanamido)-4-(((*S*)-1-((2,4-dimethylphenyl)amino)-5-methyl-1,2-dioxohexan-3-yl)amino)-4-oxobutanoat (144, BSc5378)**



Nach AAV5 werden Aldehyd **140** (250 mg, 0.437 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **141** (86 mg, 0.655 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (67  $\mu$ L, 100 mg, 0.874 mmol, 2.0 eq.) in 8 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und IBX (245 mg, 0.874 mmol, 2.0 eq.) in 5 mL DMSO umgesetzt. **BSc5378 (144)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 138 mg (0.192 mmol, 44%).

**Molmasse:** [C<sub>36</sub>H<sub>48</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>]: 719.70 g/mol.

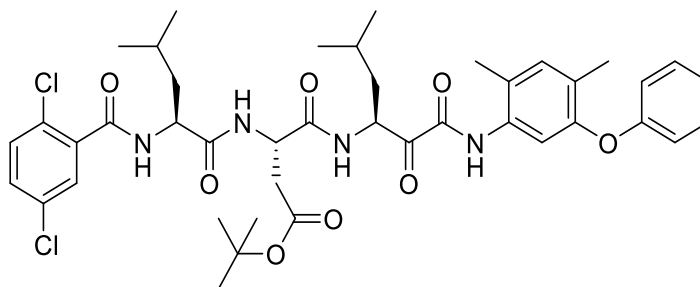
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.19 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.58 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.68 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.01 – 6.97 (m, 2H), 6.79 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 5.51 – 5.41 (m, 1H), 4.82 – 4.77 (m, 1H), 4.69 – 4.60 (m, 1H), 2.97 (dd, *J* = 17.2, 4.1 Hz, 1H), 2.58 (dd, *J* = 17.2, 6.5 Hz, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.82 – 1.72 (m, 4H), 1.72 – 1.64 (m, 1H), 1.56 – 1.48 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.00 – 0.97 (m, 9H), 0.88 – 0.86 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 196.7, 171.7, 171.3, 170.2, 165.9, 156.6, 135.9, 135.5, 133.4, 131.8, 131.6, 131.4, 131.4, 130.2, 129.0, 128.6, 127.5, 121.6, 82.2, 53.3, 53.2, 49.4, 41.0, 40.2, 36.7, 28.1, 25.3, 25.1, 23.3, 23.1, 21.8, 21.3, 21.0, 17.5.

**MS (ESI):** *m/z* = 719.30 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.66. *tert*-Butyl ((*S*)-3-((*S*)-2-(2,5-dichlorbenzamido)-4-methylpentanamido)-4-(((*S*)-1-((2,4-dimethyl-5-phenoxyphenyl)amino)-5-methyl-1,2-dioxohexan-3-yl)amino)-4-oxobutanoat (145, BSc5379)**



Nach AAV5 werden Aldehyd **140** (260 mg, 0.454 mmol, 1.0 eq.), Isocyanobenzol **106** (152 mg, 0.681 mmol, 1.5 eq.), Trifluoressigsäure (70 µL, 104 mg, 0.908 mmol, 2.0 eq.) in 8 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und IBX (254 mg, 0.908 mmol, 2.0 eq.) in 5 mL DMSO umgesetzt. **BSc5379 (145)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 184 mg (0.227 mmol, 50%).

**Molmasse:** [C<sub>42</sub>H<sub>52</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>]: 811.80 g/mol.

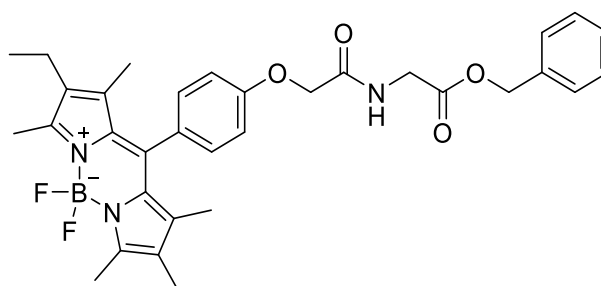
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.21 (°Hex/AcOEt = 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.64 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.71 – 7.69 (m, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H), 7.32 – 7.26 (m, 3H), 7.08 (s, 1H), 7.03 – 6.98 (m, 1H), 6.90 – 6.86 (m, 2H), 6.84 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 5.46 – 5.39 (m, 1H), 4.84 – 4.78 (m, 1H), 4.70 – 4.63 (m, 1H), 2.97 (dd, *J* = 17.2, 4.2 Hz, 1H), 2.59 (dd, *J* = 17.2, 6.5 Hz, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.84 – 1.77 (m, 2H), 1.77 – 1.67 (m, 3H), 1.55 – 1.49 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.02 – 0.96 (m, 9H), 0.88 – 0.85 (m, 3H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 196.6, 171.6, 171.3, 170.1, 165.9, 158.1, 156.4, 152.3, 135.9, 133.3, 133.1, 133.0, 131.6, 131.4, 130.1, 129.7, 129.0, 127.7, 124.3, 122.1, 116.6, 114.0, 82.2, 53.3, 53.0, 49.4, 41.0, 40.0, 36.6, 28.0, 25.2, 25.0, 23.2, 23.1, 21.7, 21.3, 16.9, 15.8.

MS (ESI): m/z = 811.32 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.67. Benzyl(2-(4-(2,8-diethyl-5,5-difluor-1,3,7,9-tetramethyl-5H $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy)acetyl)glycinat (224)**



Nach AAV9 werden Säure **147** (300 mg, 0.660 mmol, 1.0 eq.), Glycinbenzylester-*p*-Toluolsulfonat (445 mg, 1.32 mmol, 2.0 eq.), HATU (227 mg, 0.729 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (324  $\mu$ L, 247 mg, 1.91 mmol, 2.9 eq.) in 50 mL DMF umgesetzt. Die Titelverbindung **224** wird als lila Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 368 mg (0.655 mmol, 97%).

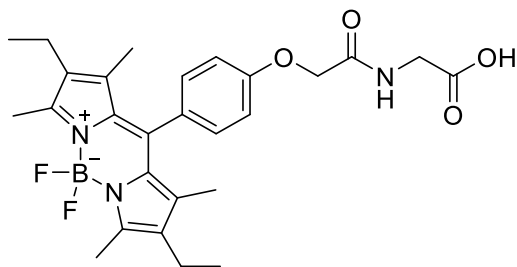
**Molmasse:** [C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]: 601.50 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.88 (°Hex/AcOEt = 1:2).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.33 – 7.26 (m, 5H), 7.15 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 2.65 (s, 1H), 2.46 (s, 6H), 2.23 (q, *J* = 7.6 Hz, 4H), 1.24 (s, 6H), 0.91 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 169.4, 168.1, 157.6, 153.9, 139.6, 138.3, 135.1, 132.9, 131.1, 130.1, 129.7, 128.8, 128.8, 128.5, 115.4, 67.5, 67.3, 41.0, 38.7, 17.2, 14.7, 12.6, 11.9.

**5.2.4.68. (2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluor-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy)acetyl)glycin (148)**



Nach AAV2 werden Benzylester **224** (386 mg, 0.655 mmol, 1.0 eq.) und 10% Pd/C (39 mg, 10 wt%) in 25 mL MeOH umgesetzt. Die Titelverbindung **148** wird als lila Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 290 mg (0.567 mmol, 85%).

**Molmasse:** [C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]: 511.38 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.53 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

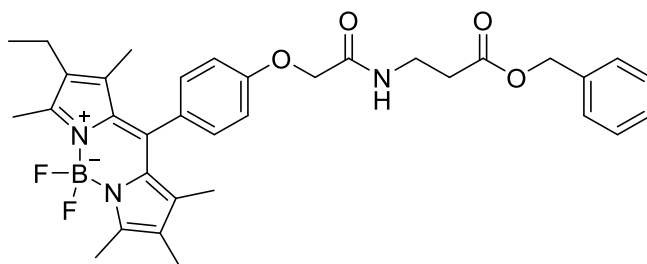
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.34 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.81 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.43 (s, 6H), 2.29 (q, *J* = 7.5 Hz, 4H), 1.31 (s, 6H), 0.94 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 171.0, 167.5, 158.1, 153.0, 140.5, 138.1, 132.5, 130.3, 129.3, 127.4, 115.5, 66.9, 40.8, 16.4, 14.5, 12.2, 11.5.

**<sup>19</sup>F-NMR** (471 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = -143.00 (dd, *J* = 66.3, 29.4 Hz).

**<sup>11</sup>B-NMR** (160 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 3.69 (t, *J* = 33.5 Hz).

**5.2.4.69. Benzyl-3-(2-(4-(2,8-diethyl-5,5-difluor-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy)acetamido)propanoat (225)**



Nach AAV9 werden Säure **147** (300 mg, 0.660 mmol, 1.0 eq.), β-Alaninbenzylester-*p*-Toluolsulfonat (464 mg, 1.32 mmol, 2.0 eq.), HATU (227 mg, 0.729 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (324 μL, 247 mg, 1.91 mmol, 2.9 eq.) in 50 mL DMF umgesetzt. Die Titelverbindung **225** wird als lila Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 284 mg (0.461 mmol, 70%).

**Molmasse:** [C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]: 615.53 g/mol.

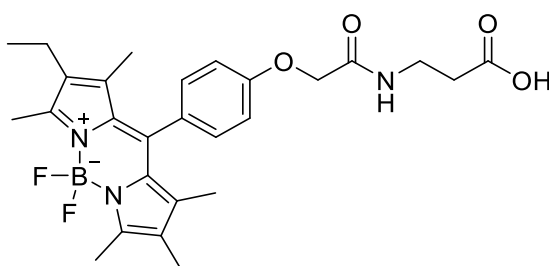


**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.62 (°Hex/AcOEt = 1:2).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.31 – 7.37 (m, 5H), 7.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.29 (s, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.67 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.52 (s, 6H), 2.29 (q, *J* = 7.6 Hz, 4H), 1.30 (s, 6H), 0.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 172.0, 167.6, 157.4, 153.8, 139.4, 138.1, 135.5, 132.7, 131.0, 129.9, 129.4, 128.6, 128.4, 128.2, 115.2, 67.2, 66.6, 38.6, 34.4, 34.0, 17.0, 14.6, 12.3, 11.8.

**5.2.4.70. 3-(2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluor-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4*λ*<sup>4</sup>,5*λ*<sup>4</sup>-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborin-10-yl)phenoxy)acetamido)propansäure (149)**



Nach AAV2 werden Benzylester **225** (284 mg, 0.461 mmol, 1.0 eq.) und 10% Pd/C (29 mg, 10 wt%) in 50 mL MeOH umgesetzt. Die Titelverbindung **149** wird als lila Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 164 mg (0.312 mmol, 47%).

**Molmasse:** [C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]: 525.40 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.86 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 40:1).

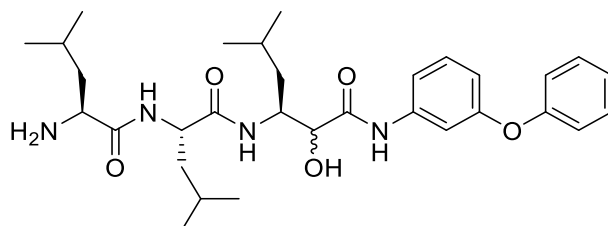
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.17 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.54 (s, 2H), 3.39 – 3.33 (m, 4H), 2.43 (s, 6H), 2.29 (q, *J* = 7.5 Hz, 4H), 1.30 (s, 6H), 0.94 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 172.8, 167.2, 158.1, 152.9, 140.5, 138.1, 132.5, 130.3, 129.3, 127.4, 115.4, 67.0, 34.5, 33.7, 16.4, 14.5, 12.2, 11.5.

**<sup>19</sup>F-NMR** (471 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = -143.00 (dd, *J* = 66.1, 30.0 Hz).

**<sup>11</sup>B-NMR** (160 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 3.68 (t, *J* = 33.6 Hz).

**5.2.4.71. (3*S*)-3-((*S*)-2-((*S*)-2-Amino-4-methylpentanamido)-4-methylpentanamido)-2-hydroxy-5-methyl-*N*-(3-phenoxyphenyl)hexanamid (150)**



Cbz-Leu-Leu-Leu-al (**2**) (957 mg, 2.01 mmol, 1.0 eq.) und Isocyanobenzol **56** (586 mg, 3.02 mmol, 1.5 eq.) werden in 25 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und auf 0°C unter einer Argonatmosphäre abgekühlt. Trifluoressigsäure (310 µL, 458 mg, 4.02 mmol, 2.0 eq.) in 1 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wird zugetropft und die Reaktionsmischung wird für 2 h bei 0°C und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Reaktion wird CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) zugegeben und es wird mit 0.1 N aq. HCl (3x 80 mL), ges. aq. NaHCO<sub>3</sub> (3x 80 mL) und ges. aq. NaCl (1x 80 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt und das Cbz-geschützte Hydroxyamid wird erhalten, welches direkt weiter umgesetzt wird. 200 mg des erhaltenen Feststoffes werden in 25 mL MeOH gelöst, zu 10% Pd/C (20 mg, 10 wt%) gegeben und die Reaktionsmischung wird für 15 min. unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach vollständiger Reaktion wird über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH = 20:1) und das freie Amin **150** wird als farbloser, amorpher Feststoff und als Diastereomeren-Gemisch erhalten.

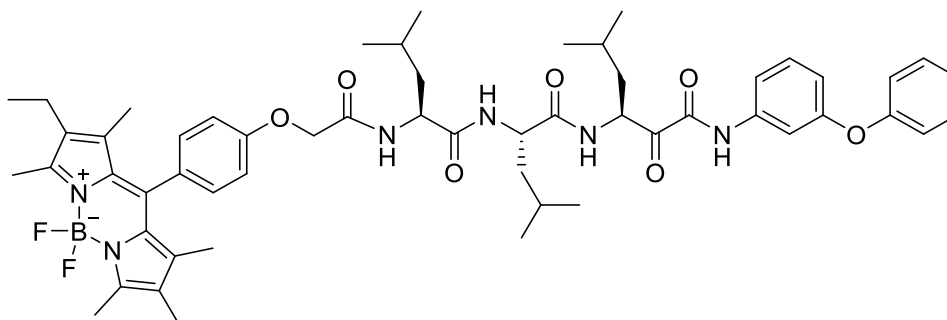
**Ausbeute:** 87 mg (0.159 mmol).

**Molmasse:** [C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>]: 554.73 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.26 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH = 20:1).

**MS (ESI):** m/z = 555.37 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.4.72. (S)-3-((S)-2-((S)-2-(2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluor-1,3,7,9-tetramethyl-5H $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy)acetamido)-4-methylpentanamido)-4-methylpentanamido)-5-methyl-2-oxo-*N*-(3-phenoxyphenyl)hexanamid (151, BSc5390)**



Nach AAV9 werden Amin **150** (87 mg, 0.159 mmol, 1.1 eq.), Carbonsäure **147** (66 mg, 0.145 mmol, 1.0 eq.), HATU (60 mg, 0.159 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (72  $\mu$ L, 54 mg, 0.421 mmol, 2.9 eq.) in 10 mL DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wird in 4 mL DMSO aufgenommen und nach AAV5 mit IBX (81 mg, 0.290 mmol, 2.0 eq.) oxidiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 2:1) und **BSc5390 (151)** wird als lila, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 48 mg (0.0485 mmol, 33%).

**Molmasse:** [C<sub>56</sub>H<sub>71</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>]: 989.03 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.47 ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 1:1).

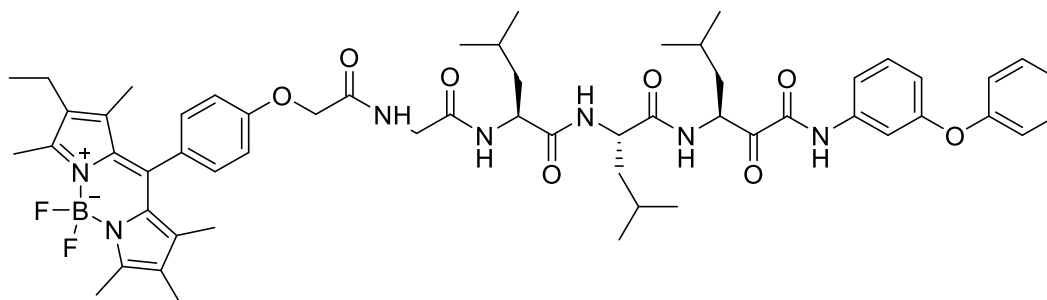
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.65 (s, 1H), 7.39 – 7.34 (m, 2H), 7.34 – 7.31 (m, 2H), 7.30 – 7.27 (m, 1H), 7.25 – 7.22 (m, 2H), 7.15 – 7.10 (m, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.03 – 6.98 (m, 3H), 6.83 – 6.78 (m, 1H), 6.64 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.39 – 5.32 (m, 1H), 4.60 – 4.53 (m, 3H), 4.51 – 4.43 (m, 1H), 2.53 (s, 6H), 2.30 (q, *J* = 7.6 Hz, 4H), 1.82 – 1.67 (m, 5H), 1.67 – 1.58 (m, 2H), 1.57 – 1.49 (m, 2H), 1.31 (s, 6H), 1.03 – 0.88 (m, 24H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 196.5, 171.7, 171.6, 168.4, 168.2, 158.3, 157.5, 156.8, 154.0, 139.5, 138.3, 137.6, 133.0, 131.2, 130.4, 130.1, 130.0, 123.9, 119.3, 119.3, 115.7, 115.4, 114.7, 110.6, 67.3, 53.1, 51.8, 51.6, 41.1, 40.7, 40.4, 25.6, 25.5, 25.1, 25.0, 24.9, 23.3, 23.1, 23.0, 22.9, 22.3, 22.3, 22.2, 22.1, 21.6, 17.2, 14.8, 12.7, 12.0.

**<sup>19</sup>F-NMR** (471 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = -145.81 (dd, *J* = 66.5, 32.1 Hz).

**MS (ESI):** *m/z* = 969.53 [M-F]<sup>+</sup>.

**5.2.4.73. (S)-3-((S)-2-((S)-2-(2-(4-(2,8-diethyl-5,5-difluor-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-dipyrrolo[1,2-c2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy)acetamido)acetamido)-4-methylpentanamido)-4-methylpentanami-do)-5-methyl-2-oxo-N-(3-phenoxyphenyl)hexanamid (152, BSc5391)**



Nach AAV9 werden Amin **150** (207mg, 0.373 mmol, 1.5 eq.), Carbonsäure **148** (127 mg, 0.249 mmol, 1.0 eq.), HATU (104 mg, 0.274 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (123  $\mu$ L, 93 mg, 0.721 mmol, 2.9 eq.) in 10 mL DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wird in 10 mL DMSO aufgenommen und nach AAV5 mit IBX (139 mg, 0.498 mmol, 2.0 eq.) oxidiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 1:1) und **BSc5391 (152)** wird als lila, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 122 mg (0.117 mmol, 47%).

**Molmasse:** [C<sub>58</sub>H<sub>74</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>]: 1046.08 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.31 ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 1:2).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 10.68 – 10.55 (m, 1H), 8.37 – 8.29 (m, 1H), 8.28 – 8.20 (m, 1H), 8.09 – 8.02 (m, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.60 – 7.55 (m, 1H), 7.53 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.44 – 7.35 (m, 2H), 7.35 – 7.30 (m, 1H), 7.28 – 7.20 (m, 2H), 7.18 – 7.12 (m, 3H), 7.03 – 6.98 (m, 2H), 6.79 – 6.74 (m, 1H), 5.09 – 4.91 (m, 1H), 4.63 – 4.57 (m, 2H), 4.36 – 4.30 (m, 2H), 3.87 – 3.78 (m, 2H), 2.43 (s, 6H), 2.35 – 2.23 (m, 4H), 1.74 – 1.64 (m, 1H), 1.62 – 1.49 (m, 4H), 1.49 – 1.37 (m, 4H), 1.32 – 1.28 (m, 6H), 0.97 – 0.91 (m, 6H), 0.91 – 0.81 (m, 14H), 0.81 – 0.76 (m, 4H).

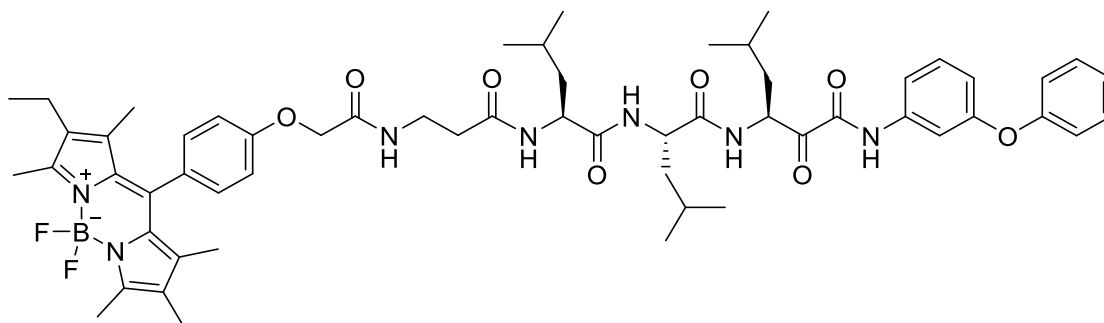
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 196.8, 172.1, 171.6, 168.3, 167.7, 159.7, 158.1, 156.9, 156.3, 152.9, 140.4, 139.0, 138.1, 132.4, 130.3, 130.0, 129.3, 127.4, 123.6, 118.7, 115.4, 115.2, 114.4, 110.4, 66.9, 52.1, 51.0, 50.5, 41.7, 40.9, 40.7, 38.1, 24.4, 24.1, 24.0, 23.0, 22.7, 21.8, 21.6, 21.0, 16.4, 14.5, 12.2, 11.5.

**<sup>19</sup>F-NMR** (471 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = -143.01 (dd, *J* = 66.5, 28.6 Hz).

**<sup>11</sup>B-NMR** (160 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 3.69 (t, *J* = 33.4 Hz).

**MS (ESI):** *m/z* = 1026.56 [M-F]<sup>+</sup>.

**5.2.4.74. (S)-3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(4-(2,8-diethyl-5,5-difluor-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-dipyrrolo[1,2-c2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy)acetamido)propanamido)-4-methylpentanamido)-4-methylpentan-amido)-5-methyl-2-oxo-N-(3-phenoxyphenyl)hexanamid (153, BSc5392)**



Nach AAV9 werden Amin **150** (207mg, 0.373 mmol, 1.5 eq.), Carbonsäure **149** (130 mg, 0.249 mmol, 1.0 eq.), HATU (104 mg, 0.274 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (123  $\mu$ L, 93 mg, 0.721 mmol, 2.9 eq.) in 10 mL DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wird in 10 mL DMSO aufgenommen und nach AAV5 mit IBX (139 mg, 0.498 mmol, 2.0 eq.) oxidiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 1:2) und **BSc5392 (153)** wird als lila, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 75 mg (0.0707 mmol, 28%).

**Molmasse:** [C<sub>59</sub>H<sub>76</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>]: 1060.10 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.29 ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 1:5).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 10.63 (s, 1H), 8.31 – 8.26 (m, 1H), 8.14 – 8.08 (m, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.90 – 7.81 (m, 1H), 7.59 – 7.56 (m, 1H), 7.55 – 7.51 (m, 1H), 7.39 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.35 – 7.30 (m, 1H), 7.27 – 7.23 (m, 2H), 7.17 – 7.11 (m, 3H), 7.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.79 – 6.74 (m, 1H), 5.03 – 4.92 (m, 1H), 4.52 (s, 2H), 4.40 – 4.26 (m, 2H), 3.39 – 3.33 (m, 2H), 2.43 (s, 6H), 2.38 – 2.32 (m, 2H), 2.28 (q, *J* = 7.5 Hz, 4H), 1.73 – 1.65 (m, 1H), 1.61 – 1.49 (m, 4H), 1.47 – 1.37 (m, 4H), 1.30 (s, 6H), 0.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H), 0.91 – 0.85 (m, 5H), 0.85 – 0.77 (m, 13H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 196.8, 172.3, 172.2, 171.8, 171.7, 170.5, 170.4, 167.1, 159.7, 159.5, 158.0, 156.9, 156.3, 152.9, 140.4, 139.0, 138.1, 132.4, 130.3, 130.0, 129.3, 127.4, 123.5, 118.7, 115.4, 115.2, 114.4, 110.4, 67.0, 52.1, 51.0, 50.5, 41.1, 40.8, 40.7, 40.5, 38.1, 35.2, 35.0, 24.4, 24.2, 24.0, 23.0, 23.0, 22.8, 21.7, 21.6, 21.0, 20.8, 16.4, 14.5, 12.2, 11.5.

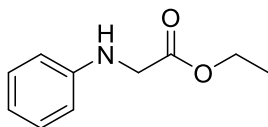
**<sup>19</sup>F-NMR** (471 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = -143.02 (dd, *J* = 66.5, 28.6 Hz).

**<sup>11</sup>B-NMR** (160 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 3.68 (t, *J* = 33.8 Hz).

**MS (ESI):** *m/z* = 1040.57 [M-F]<sup>+</sup>.

## 5.2.5. Darstellung der Inhibitoren des Immunoproteasoms

### 5.2.5.1. *N*-Phenylglycinethylester (**162**)



Anilin (**166**) (1.96 mL, 2.00 g, 21.4 mmol, 1.0 eq.) und DIPEA (7.28 mL, 5.53 g, 42.9 mmol, 2.0 eq.) werden in Acetonitril gelöst und auf 60 °C erhitzt. Bromessigsäureethylester **165** (2.62 mL, 3.93 g, 23.5 mmol, 1.1 eq.) wird zugetropft und für 4 h bei 60 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt und Wasser zugegeben. Der ausgefallene Feststoff wird abgefiltert und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (°Hex/AcOEt = 5:1) und Ethylester **162** wird als brauner, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 2.96 g (16.5 mmol, 77%).

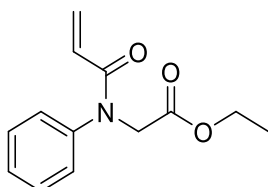
**Molmasse:** [C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>]: 179.22 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.33 (°Hex/AcOEt = 5:1).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.24 – 7.17 (m, 2H), 6.81 – 6.74 (m, 1H), 6.66 – 6.61 (m, 2H), 4.25 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.91 (s, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 171.2, 147.0, 129.4, 118.5, 113.3, 61.4, 46.1, 14.3.

### 5.2.5.2. *N*-Acryloyl-*N*-phenylglycinethylester (**169**)



Ethylester **162** (1.00 g, 5.58 mmol, 1.0 eq.) wird in 12 mL trockenem THF vorgelegt und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wird Acryloylchlorid (682 µL, 758 mg, 8.37 mmol, 1.5 eq.) und Triethylamin (2.32 mL, 1.69 g, 16.7 mmol, 3.0 eq.) zugegeben und es wird über Nacht bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird der entstandene Feststoff abgefiltert, das Filtrat am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt und der Rückstand wird in 100 mL AcOEt aufgenommen. Es wird mit 0.1 N aq. HCl (2x 50 mL), ges. aq. NaHCO<sub>3</sub> (1x 50 mL) und ges. aq. NaCl-Lösung (1x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (°Hex/AcOEt, 5:1) und Ethylester **169** wird als gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 885 mg (3.79 mmol, 58%).

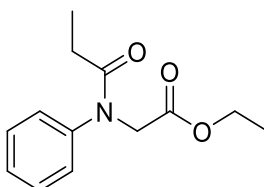
**Molmasse:** [C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>]: 233.27 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.26 (°Hex/AcOEt = 5:1).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.42 – 7.38 (m, 2H), 7.36 – 7.30 (m, 3H), 6.40 (dd, *J* = 16.8, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (dd, *J* = 16.8, 10.3 Hz, 1H), 5.56 (dd, *J* = 10.4, 1.9 Hz, 1H), 4.44 (s, 2H), 4.20 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 169.1, 166.0, 142.4, 129.7, 128.5, 128.2, 127.9, 61.4, 51.7, 14.3.

#### 5.2.5.3. *N*-Phenyl-*N*-propionylglycinethylester (**179**)



Ethylester **162** (500 mg, 2.79 mmol, 1.0 eq.) wird in 6 mL trockenem THF vorgelegt und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wird Propionylchlorid (292 µL, 310 mg, 3.35 mmol, 1.2 eq.) und Triethylamin (1.16 mL, 847 mg, 8.37 mmol, 3.0 eq.) zugegeben und es wird über Nacht bei RT gerührt. Es wird weiteres Propionylchlorid zugegeben (122 µL, 130 mg, 1.40 mmol, 0.5 eq.) Nach beendeter Reaktion wird der entstandene Feststoff abgefiltert, das Filtrat am Rotationsverdampfer im Vakuum eingengt und der Rückstand wird in 50 mL AcOEt aufgenommen. Es wird mit 0.1 N aq. HCl (2x 25 mL), ges. aq. NaHCO<sub>3</sub> (1x 25 mL) und ges. aq. NaCl-Lösung (1x 25 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (°Hex/AcOEt, 3:1) und Ethylester **179** wird als farbloses Öl erhalten.

**Ausbeute:** 584 mg (2.48 mmol, 89%).

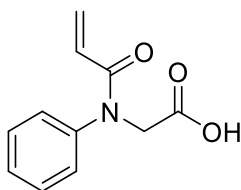
**Molmasse:** [C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>]: 235.28 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.49 (°Hex/AcOEt = 2:1).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.42 – 7.38 (m, 2H), 7.36 – 7.32 (m, 3H), 4.34 (s, 2H), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.14 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.05 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 174.4, 169.4, 143.2, 129.8, 128.3, 61.3, 51.5, 27.5, 14.3, 9.5.

#### 5.2.5.4. *N*-Acryloyl-*N*-phenylglycin (**160**)



Ethylester **169** (648 mg, 2.78 mmol, 1.0 eq.) wird in 30 mL einer THF/Wasser (4:1)-Mischung vorgelegt, Lithiumhydroxid (73 mg, 3.06 mmol, 1.1 eq.) wird zugegeben und die Reaktionsmischung 4 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das THF am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt und es wird Wasser (30 mL) zugegeben. Die wässrige Phase wird mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 15 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wird mit 1 N aq. HCl angesäuert und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Die freie Säure **160** wird als farbloser Feststoff erhalten.

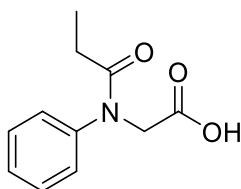
**Ausbeute:** 495 mg (2.41 mmol, 87%).

**Molmasse:** [C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>]: 205.21 g/mol.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm 12.73 (s, 1H), 7.48 – 7.43 (m, 2H), 7.40 – 7.35 (m, 1H), 7.34 – 7.30 (m, 2H), 6.19 (dd, *J* = 16.8, 2.3 Hz, 1H), 6.04 (dd, *J* = 16.8, 10.2 Hz, 1H), 5.62 (dd, *J* = 10.2, 2.3 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 170.2, 164.5, 142.1, 129.4, 128.1, 128.0, 127.7, 51.1.

#### 5.2.5.5. *N*-Phenyl-*N*-propionylglycin (**180**)



Ethylester **179** (385 mg, 1.64 mmol, 1.0 eq.) wird in 24 mL einer THF/Wasser/MeOH (4:1:1)-Mischung vorgelegt, Lithiumhydroxid (118 mg, 4.91 mmol, 3.0 eq.) wird zugegeben und die Reaktionsmischung wird 3 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird die wässrige Phase mit 1 N aq. HCl angesäuert und mit AcOEt (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Die freie Säure **180** wird als farbloser Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 310 mg (1.50 mmol, 91%).

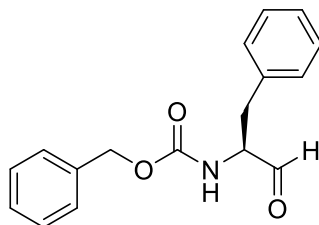
**Molmasse:** [C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>]: 207.23 g/mol.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 10.20 (s, 1H), 7.44 – 7.39 (m, 2H), 7.38 – 7.32 (m, 3H), 4.40 (s, 2H), 2.15 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).



<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 175.19, 173.71, 142.84, 129.98, 128.56, 128.10, 51.56, 27.47, 9.50.

#### 5.2.5.6. *N*-Cbz-(*S*)-phenylalaninal (**163**)



Nach AAV11 werden Phenylalaninol **167** (2.00 g, 7.06 mmol, 1.0 eq.) und IBX (3.95 g, 14.1 mmol, 2.0 eq.) in 25 mL DMSO umgesetzt. Phenylalaninal **163** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1.40 g (4.94 mmol, 70%).

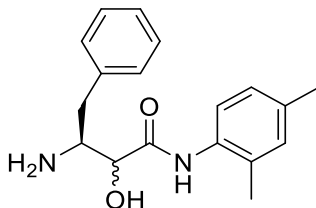
**Molmasse:** [C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>]: 283.33 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.51 (°Hex/AcOEt = 2:1).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.58 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.38 – 7.19 (m, 10H), 5.05 – 4.98 (m, 2H), 4.23 – 4.18 (m, 1H), 3.15 (dd, *J* = 14.0, 4.6 Hz, 1H), 2.74 (dd, *J* = 14.1, 10.3 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO) δ 200.8, 156.1, 137.6, 136.9, 129.1, 128.3, 128.2, 127.7, 127.5, 126.3, 65.5, 61.1, 33.3.

#### 5.2.5.7. (3*S*)-3-Amino-*N*-(2,4-dimethylphenyl)-2-hydroxy-4-phenylbutanamid (**173**)



Cbz-Phe-al **163** (700 mg, 2.47 mmol, 1.0 eq.) und Isocyanobenzol **141** (486 mg, 3.71 mmol, 1.5 eq.) werden in 12 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und auf 0°C unter einer Argonatmosphäre abgekühlt. Trifluoressigsäure (381 µL, 568 mg, 4.94 mmol, 2.0 eq.) in 1 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wird zugetropft und die Reaktionsmischung wird für 2 h bei 0°C und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Reaktion wird AcOEt (120 mL) zugegeben und es wird mit 0.1 N aq. HCl (3x 80 mL), ges. aq. NaHCO<sub>3</sub> (3x 80 mL) und ges. aq. NaCl (1x 60 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt und das Cbz-geschützte Hydroxyamid wird als gelber Feststoff erhalten. Dieser wird direkt in 50 mL MeOH gelöst, zu 10% Pd/C (64 mg, 10 wt%) gegeben und die Reaktionsmischung wird für 15 min. unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach vollständig abgelaufener Reaktion wird über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an

Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}\text{Hex} / \text{AcOEt} = 1:1$ ) und das freie Amin **173** wird als farbloser amorpher Feststoff und als Diastereomeren-Gemisch erhalten.

**Ausbeute:** 447 mg (1.49 mmol, 60%).

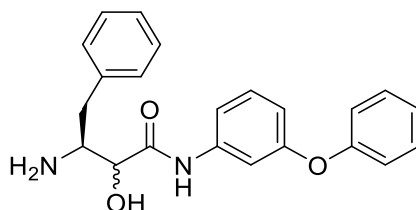
**Molmasse:**  $[\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2]$ : 298.39 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.23 ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{AcOEt} = 1:1$ ).

**$^1\text{H}$ -NMR** (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 9.20$  (s, 2H), 7.56 – 7.47 (m, 1H), 7.34 – 7.16 (m, 5H), 7.04 – 6.92 (m, 2H), 3.98 (d,  $J = 4.4$  Hz, 0.5H), 3.88 (d,  $J = 2.5$  Hz, 0.5H), 3.25 – 3.15 (m, 1H), 2.83 (dd,  $J = 13.2, 6.2$  Hz, 1H), 2.59 (dd,  $J = 13.2, 7.8$  Hz, 1H), 2.24 (s, 3H), 2.18 (s, 3H).

**$^{13}\text{C}$ -NMR** (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 171.6, 139.7, 133.5, 133.4, 130.7, 129.7, 129.3, 128.2, 128.1, 126.5, 125.9, 123.0, 75.3, 73.2, 55.9, 55.4, 20.4, 17.5$ .

#### 5.2.5.8. (3*S*)-3-Amino-2-hydroxy-*N*-(3-phenoxyphenyl)-4-phenylbutanamid (**174**)



Cbz-Phe-al **163** (600 mg, 2.12 mmol, 1.0 eq.) und Isocyanobenzol **56** (620 mg, 3.18 mmol, 1.5 eq.) werden in 12 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und auf  $0^{\circ}\text{C}$  unter einer Argonatmosphäre abgekühlt. Trifluoressigsäure (327  $\mu\text{L}$ , 483 mg, 4.24 mmol, 2.0 eq.) in 1 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wird zugetropft und die Reaktionsmischung wird für 2 h bei  $0^{\circ}\text{C}$  und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Reaktion wird AcOEt (120 mL) zugegeben und es wird mit 0.1 N aq. HCl (3x 80 mL), ges. aq.  $\text{NaHCO}_3$  (3x 80 mL) und ges. aq. NaCl (1x 60 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt und das Cbz-geschützte Hydroxyamid wird als gelber Feststoff erhalten. Dieser wird direkt in 50 mL MeOH gelöst, zu 10% Pd/C (75 mg, 10 wt%) gegeben und die Reaktionsmischung wird für 15 min. unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach vollständig abgelaufener Reaktion wird über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}\text{Hex} / \text{AcOEt} = 1:1$ ) und das freie Amin **174** wird als gelber, amorpher Feststoff und als Diastereomeren-Gemisch erhalten.

**Ausbeute:** 539 mg (1.49 mmol, 70%).

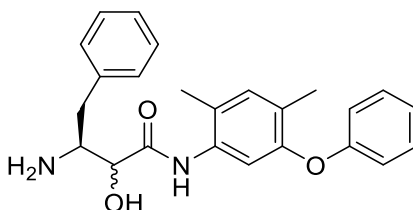
**Molmasse:**  $[\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3]$ : 362.43 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.21 ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{AcOEt} = 1:1$ ).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 7.51 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.48 – 7.34 (m, 4H), 7.22 (tq, *J* = 22.9, 7.1 Hz, 7H), 7.01 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.72 – 6.66 (m, 1H), 3.89 (d, *J* = 4.8 Hz, 0.5H), 3.84 (d, *J* = 2.6 Hz, 0.5H), 3.23 – 3.13 (m, 1H), 2.79 (dd, *J* = 13.3, 6.3 Hz, 1H), 2.57 (dd, *J* = 13.2, 7.7 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 172.4, 171.8, 156.8, 156.5, 140.1, 139.7, 130.0, 129.8, 129.3, 129.2, 128.2, 128.0, 125.9, 123.4, 118.7, 114.5, 113.4, 109.8, 109.7, 75.7, 73.4, 55.4, 41.0.

#### 5.2.5.9. (3*S*)-3-Amino-*N*-(2,4-dimethyl-5-phenoxyphenyl)-2-hydroxy-4-phenylbutan- amid (**175**)



Cbz-Phe-al **163** (700 mg, 2.47 mmol, 1.0 eq.) und Isocyanobenzol **76** (828 mg, 3.71 mmol, 1.5 eq.) werden in 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und auf 0°C unter einer Argonatmosphäre abgekühlt. Trifluoressigsäure (381 µL, 568 mg, 4.94 mmol, 2.0 eq.) in 1 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wird zugetropft und die Reaktionsmischung wird für 2 h bei 0°C und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Reaktion wird AcOEt (120 mL) zugegeben und es wird mit 0.1 N aq. HCl (3x 80 mL), ges. aq. NaHCO<sub>3</sub> (3x 80 mL) und ges. aq. NaCl (1x 60 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt und das Cbz-geschützte Hydroxyamid wird als gelber Feststoff erhalten. Dieser wird direkt in 50 mL MeOH gelöst, zu 10% Pd/C (85 mg, 10 wt%) gegeben und die Reaktionsmischung wird für 15 min. unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach vollständig abgelaufener Reaktion wird über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (°Hex / AcOEt = 1:1) und das freie Amin **175** wird als gelber, amorpher Feststoff und als Diastereomeren-Gemisch erhalten.

**Ausbeute:** 623 mg (1.60 mmol, 65%).

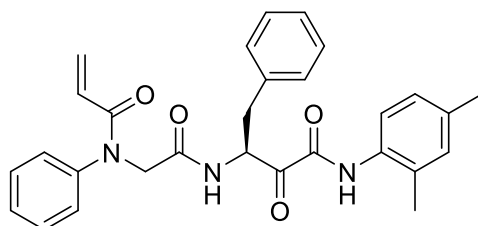
**Molmasse:** [C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>]: 390.48 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.27 (°Hex/AcOEt = 1:1).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 7.42 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 7.38 – 7.13 (m, 9H), 7.09 – 7.01 (m, 1H), 6.89 – 6.83 (m, 2H), 3.94 (d, *J* = 4.5 Hz, 0.5H), 3.85 (d, *J* = 2.5 Hz, 0.5H), 3.31 (s, 2H), 3.23 – 3.13 (m, 1H), 2.86 – 2.74 (m, 1H), 2.63 – 2.54 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.09 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 171.6, 157.5, 151.3, 139.6, 134.9, 132.6, 129.8, 129.2, 128.2, 128.1, 125.9, 124.7, 122.3, 116.6, 114.1, 113.7, 75.1, 73.0, 55.8, 55.2, 16.8, 15.2.

**5.2.5.10. (S)-N-(2,4-Dimethylphenyl)-2-oxo-4-phenyl-3-(2-(N-phenylacrylamido)acetamido)butanamid (155, BSc5429)**



Nach AAV9 werden Amin **173** (223 mg, 0.747 mmol, 1.0 eq.), Carbonsäure **160** (154 mg, 0.747 mmol, 1.0 eq.), HATU (313 mg, 0.822 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (369  $\mu$ L, 280 mg, 2.17 mmol, 2.9 eq.) in 16 mL DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wird in 10 mL DMSO aufgenommen und nach AAV5 mit IBX (418 mg, 1.49 mmol, 2.0 eq.) oxidiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 1:1) und **BSc5429 (155)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 220 mg (0.455 mmol, 61%).

**Molmasse:** [C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]: 483.57 g/mol.

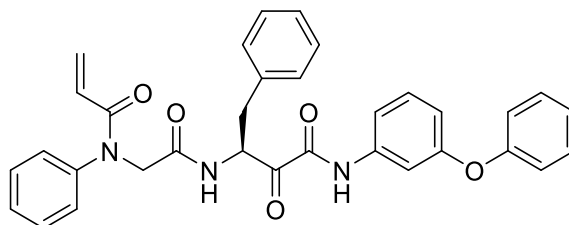
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.27 ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 9.99 (s, 1H), 8.54 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.43 – 7.30 (m, 3H), 7.29 – 7.14 (m, 8H), 7.07 – 6.96 (m, 2H), 6.17 (dd, *J* = 16.8, 2.5 Hz, 1H), 6.08 – 5.95 (m, 1H), 5.59 (dd, *J* = 10.0, 2.6 Hz, 1H), 5.26 (dq, *J* = 8.4, 5.1 Hz, 1H), 4.42 – 4.24 (m, 2H), 3.17 (dd, *J* = 13.9, 4.7 Hz, 1H), 2.89 (dd, *J* = 13.9, 8.9 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.11 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 196.2, 168.1, 159.4, 142.3, 137.1, 132.9, 132.1, 130.9, 129.3, 129.1, 128.3, 127.8, 126.5, 125.6, 55.4, 51.6, 35.4, 20.5, 17.6.

**MS (ESI):** *m/z* = 484.22 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.5.11. (S)-2-Oxo-N-(3-phenoxyphenyl)-4-phenyl-3-(2-(N-phenylacrylamido)acetamido)butanamid (156, BSc5431)**



Nach AAV9 werden Amin **174** (260 mg, 0.717 mmol, 1.0 eq.), Carbonsäure **160** (147 mg, 0.717 mmol, 1.0 eq.), HATU (300 mg, 0.789 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (354  $\mu$ L, 269 mg, 2.08 mmol, 2.9 eq.) in 16 mL DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wird in 10 mL DMSO aufgenommen und nach AAV5 mit IBX (402 mg, 1.43 mmol, 2.0 eq.) oxidiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 1:1) und **BSc5431 (156)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 231 mg (0.422 mmol, 59%).

**Molmasse:** [C<sub>33</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>]: 547.61 g/mol.

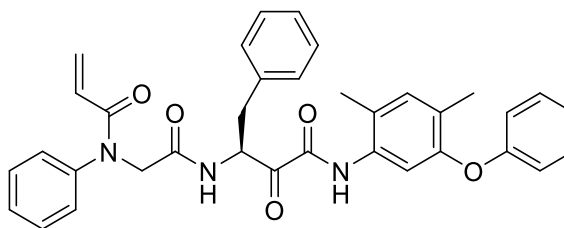
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.29 (°Hex/AcOEt = 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 10.67 (s, 1H), 8.58 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.59 (ddd, *J* = 8.2, 2.0, 1.0 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.44 – 7.12 (m, 14H), 7.06 – 7.00 (m, 2H), 6.82 – 6.77 (m, 1H), 6.15 (dd, *J* = 16.7, 2.5 Hz, 1H), 6.06 – 5.92 (m, 1H), 5.61 – 5.53 (m, 1H), 5.26 – 5.17 (m, 1H), 4.41 – 4.21 (m, 2H), 3.16 (dd, *J* = 14.0, 4.6 Hz, 1H), 2.86 (dd, *J* = 14.0, 9.1 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 195.6, 168.1, 164.4, 159.2, 156.9, 156.3, 142.2, 139.1, 137.1, 130.0, 129.3, 129.0, 128.3, 127.7, 127.6, 126.5, 123.6, 118.8, 115.4, 114.5, 110.5, 55.2, 51.5, 35.3.

**MS (ESI):** *m/z* = 548.22 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 5.2.5.12. (*S*)-*N*-(2,4-Dimethyl-5-phenoxyphenyl)-2-oxo-4-phenyl-3-(2-(*N*-phenylacrylamido)acetamido)butanamid (**157**, BSc5433)



Nach AAV9 werden Amin **175** (300 mg, 0.768 mmol, 1.0 eq.), Carbonsäure **160** (158 mg, 0.768 mmol, 1.0 eq.), HATU (321 mg, 0.845 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (379 µL, 288 mg, 2.23 mmol, 2.9 eq.) in 16 mL DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wird in 10 mL DMSO aufgenommen und nach AAV5 mit IBX (430 mg, 1.54 mmol, 2.0 eq.) oxidiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (°Hex/AcOEt = 1:1) und **BSc5433 (157)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 223 mg (0.387 mmol, 50%).

**Molmasse:** [C<sub>35</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>]: 575.67 g/mol.

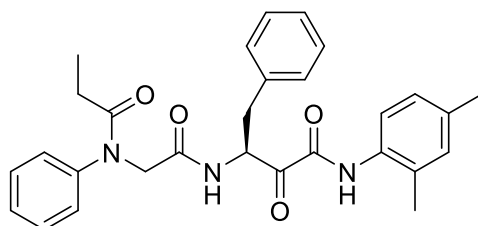
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.31 (°Hex/AcOEt = 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 9.97 (s, 1H), 8.54 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.40 – 7.30 (m, 5H), 7.25 – 7.12 (m, 8H), 7.10 – 7.03 (m, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.92 – 6.85 (m, 2H), 6.15 (dd, *J* = 16.8, 2.5 Hz, 1H), 6.06 – 5.92 (m, 1H), 5.61 – 5.54 (m, 1H), 5.27 – 5.16 (m, 1H), 4.39 – 4.22 (m, 2H), 3.13 (dd, *J* = 13.9, 4.9 Hz, 1H), 2.86 (dd, *J* = 13.9, 8.9 Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.12 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 195.9, 168.0, 159.1, 157.4, 151.3, 142.2, 137.0, 133.4, 132.9, 129.9, 129.3, 129.0, 128.5, 128.3, 128.2, 127.7, 127.2, 126.5, 122.5, 116.7, 55.2, 51.6, 35.5, 16.9, 15.3.

**MS (ESI):** *m/z* = 576.25 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.5.13. (S)-N-(2,4-Dimethylphenyl)-2-oxo-4-phenyl-3-(2-(N-phenylpropionamido)acetamido)butanamid (176, BSc5430)**



Nach AAV9 werden Amin **173** (223 mg, 0.747 mmol, 1.0 eq.), Carbonsäure **180** (155 mg, 0.747 mmol, 1.0 eq.), HATU (313 mg, 0.822 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (369  $\mu$ L, 280 mg, 2.17 mmol, 2.9 eq.) in 16 mL DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wird in 10 mL DMSO aufgenommen und nach AAV5 mit IBX (418 mg, 1.49 mmol, 2.0 eq.) oxidiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 1:1) und **BSc5430 (176)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 161 mg (0.322 mmol, 44%).

**Molmasse:** [C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]: 485.58 g/mol.

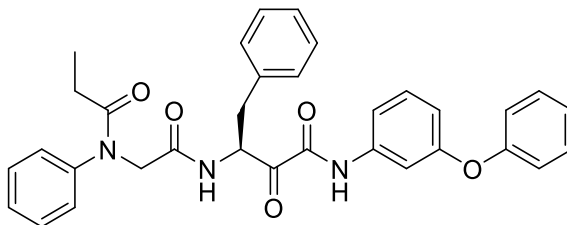
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.25 ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 9.99 (s, 1H), 8.44 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.42 – 7.13 (m, 11H), 7.05 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J* = 8.0, 2.1 Hz, 1H), 5.31 – 5.20 (m, 1H), 4.31 – 4.15 (m, 2H), 3.16 (dd, *J* = 13.9, 4.7 Hz, 1H), 2.88 (dd, *J* = 13.9, 8.9 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.07 – 1.96 (m, 2H), 0.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 196.18, 168.36, 159.38, 137.12, 135.52, 132.83, 132.05, 130.85, 129.35, 129.04, 128.26, 127.93, 126.50, 125.57, 55.38, 51.46, 35.38, 26.71, 20.50, 17.54, 9.34.

**MS (ESI):** *m/z* = 486.24 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.5.14. (S)-2-Oxo-N-(3-phenoxyphenyl)-4-phenyl-3-(2-(N-phenylpropionamido)acetamido)butanamide (177, BSc5432)**



Nach AAV9 werden Amin **174** (260 mg, 0.717 mmol, 1.0 eq.), Carbonsäure **180** (149 mg, 0.717 mmol, 1.0 eq.), HATU (300 mg, 0.789 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (354  $\mu$ L, 269 mg, 2.08 mmol, 2.9 eq.) in 16 mL DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wird in 10 mL DMSO aufgenommen und nach AAV5 mit IBX (418 mg, 1.49 mmol, 2.0 eq.) oxidiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}$ Hex/AcOEt = 1:1) und **BSc5432 (177)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 238 mg (0.433 mmol, 60%).

**Molmasse:** [C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>]: 549.63 g/mol.

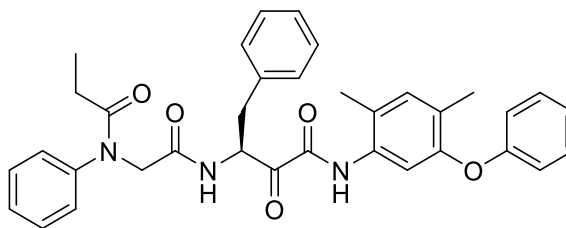
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.27 (°Hex/AcOEt = 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.67 (s, 1H), 8.56 – 8.41 (m, 1H), 7.62 – 7.51 (m, 2H), 7.44 – 7.34 (m, 3H), 7.34 – 7.12 (m, 11H), 7.07 – 6.98 (m, 2H), 6.80 (dd, *J* = 8.0, 2.3 Hz, 1H), 5.25 – 5.15 (m, 1H), 4.29 – 4.12 (m, 2H), 3.16 (dd, *J* = 14.0, 4.7 Hz, 1H), 2.85 (dd, *J* = 14.0, 9.1 Hz, 1H), 2.06 – 1.92 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 195.58, 172.54, 168.44, 159.27, 156.86, 156.33, 139.07, 137.15, 130.02, 129.30, 129.03, 128.25, 127.81, 126.47, 123.58, 118.77, 115.34, 114.53, 110.49, 55.24, 51.33, 35.25, 26.60, 9.30.

**MS (ESI):** *m/z* = 550.23 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 5.2.5.15. (*S*)-*N*-(2,4-Dimethyl-5-phenoxyphenyl)-2-oxo-4-phenyl-3-(2-(*N*-phenylpropionamido)acetamido)butanamide (**178**, BSc5434)



Nach AAV9 werden Amin **175** (300 mg, 0.768 mmol, 1.0 eq.), Carbonsäure **180** (159 mg, 0.768 mmol, 1.0 eq.), HATU (321 mg, 0.845 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (379 µL, 288 mg, 2.23 mmol, 2.9 eq.) in 16 mL DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wird in 10 mL DMSO aufgenommen und nach AAV5 mit IBX (430 mg, 1.54 mmol, 2.0 eq.) oxidiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (°Hex/AcOEt = 1:1) und **BSc5434 (178)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 269 mg (0.466 mmol, 61%).

**Molmasse:** [C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>]: 577.68 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.29 (°Hex/AcOEt = 1:1).

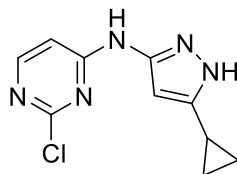
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 9.96 (s, 1H), 8.44 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.40 – 7.11 (m, 13H), 7.10 – 7.03 (m, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.88 (dt, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 2H), 5.27 – 5.16 (m, 1H), 4.27 – 4.12 (m, 2H), 3.13 (dd, *J* = 13.9, 4.9 Hz, 1H), 2.86 (dd, *J* = 13.9, 8.9 Hz, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.05 – 1.95 (m, 2H), 0.89 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 195.9, 168.3, 159.2, 157.4, 151.3, 137.0, 133.4, 132.9, 129.9, 129.3, 129.0, 128.5, 128.2, 127.9, 127.1, 126.5, 122.5, 116.7, 55.2, 35.4, 16.9, 15.3, 9.3.

**MS (ESI):** *m/z* = 578.27 [M+H]<sup>+</sup>.

## 5.2.6. Darstellung der FLT3-Inhibitoren

### 5.2.6.1. 2-Chlor-*N*-(5-cyclopropyl-1H-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (**195**)



2,4-Dichloropyrimidin (2.50 g, 16.8 mmol, 1.0 eq), Amin **196** (2.07 g, 16.8 mmol, 1.0 eq.) und DIPEA (4.29 mL, 3.26 g, 25.2 mmol, 1.5 eq.) werden in 8 mL DMSO gelöst und für 24 h bei 60 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Reaktionsgemisch auf Eiswasser gegeben und der entstandene Feststoff wird abgefiltert. Die Titelverbindung **195** wird als beiger Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 3.40 g (14.4 mmol, 86%).

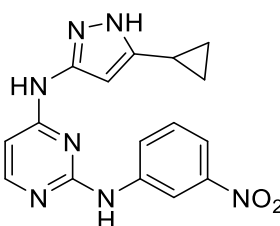
**Molmasse:** [C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>5</sub>]: 235.68 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.13 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 20:1).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 12.18 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 8.15 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.44 – 6.97 (s, br, 1H), 5.97 (s, 1H), 1.89 (tt, *J* = 8.4, 5.1 Hz, 1H), 0.98 – 0.88 (m, 2H), 0.73 – 0.65 (m, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 160.8, 157.7, 147.2, 146.0, 104.8, 104.7, 92.7, 7.7, 6.7.

### 5.2.6.2. *N*-(5-Cyclopropyl-1H-pyrazol-3-yl)-*N*-(3-nitrophenyl)pyrimidin-2,4-diamin (**197**)



Chloripyrimidin **195** (2.50 g, 10.6 mmol, 1.0 eq) und 3-Nitroanilin (1.47 g, 10.6 mmol, 1.0 eq.) werden in 15 mL Isopropanol gelöst. Konz. HCl (3 Tropfen) wird zugegeben und die Reaktionsmischung wird für 48 h bei 70 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird auf RT abgekühlt, der gebildete Feststoff abgefiltert und mit Isopropanol gewaschen. Die Titelverbindung **197** wird als gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 3.24 g (9.60 mmol, 91%).

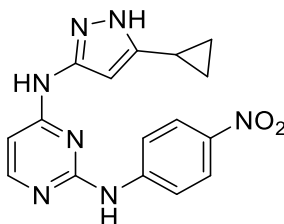
**Molmasse:** [C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]: 337.34 g/mol.



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 11.29 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.15 – 7.91 (m, 2H), 7.71 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 1.83 (tt, *J* = 9.5, 5.3 Hz, 1H), 0.91 (h, *J* = 4.3 Hz, 2H), 0.54 (s, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 159.7, 152.8, 148.0, 145.3, 138.6, 130.3, 128.3, 118.9, 99.9, 93.3, 7.7, 6.6.

#### 5.2.6.3. *N*<sup>4</sup>-(5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-*N*<sup>2</sup>-(4-nitrophenyl)pyrimidin-2,4-diamin (198)



Chlorpyrimidin **195** (2.50 g, 10.6 mmol, 1.0 eq) und 4-Nitroanilin (1.47 g, 10.6 mmol, 1.0 eq.) werden in 15 mL Isopropanol gelöst. Konz. HCl (3 Tropfen) wird zugegeben und die Reaktionsmischung wird für 48 h bei 70 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird auf RT abgekühlt, der gebildete Feststoff abgefiltert und mit Isopropanol gewaschen. Die Titelverbindung **198** wird als gelber Feststoff erhalten.

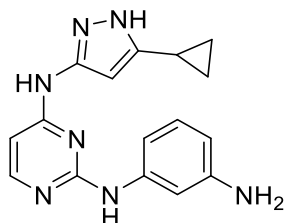
**Ausbeute:** 3.18 g (9.43 mmol, 89%).

**Molmasse:** [C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]: 337.34 g/mol.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 11.53 (s, 1H), 11.36 (s, 1H), 8.33 – 8.19 (m, 2H), 8.16 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J* = 8.5, 2.8 Hz, 2H), 6.72 (d, *J* = 18.9 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 1.94 (tt, *J* = 8.5, 5.0 Hz, 1H), 1.01 – 0.92 (m, 2H), 0.71 – 0.62 (m, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 159.7, 147.4, 145.1, 144.2, 142.4, 126.3, 124.7, 120.7, 112.4, 100.0, 93.0, 25.5, 8.0, 6.7.

#### 5.2.6.4. *N*<sup>2</sup>-(3-Aminophenyl)-*N*<sup>4</sup>-(5-cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)pyrimidin-2,4-diamin (199)



Zinn(II)-chlorid-Dihydrat (9.00 g, 39.9 mmol, 3.0 eq.) wird in 40 mL Essigsäure suspendiert und 15 mL konz. HCl werden zugegeben. Nitroverbindung **197** (4.48 g, 13.3 mmol, 1.0 eq.) wird zugegeben und die Reaktionsmischung wird für 4 h bei 80 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Mischung auf RT abgekühlt, der gebildete Feststoff wird abgefiltert, in

Wasser gelöst und die Lösung wird mit Natriumhydroxid auf pH 10 eingestellt. Es wird mit AcOEt (3x 50 mL extrahiert), die vereinigten organischen Extrakte werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Amin **199** wird als hellgelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 2.45 g (7.97 mmol, 60%).

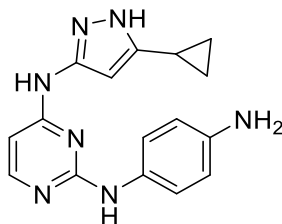
**Molmasse:** [C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>]: 307.36 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.31 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 11.95 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.11 – 6.77 (m, 3H), 6.57 – 6.10 (m, 2H), 4.87 (s, 2H), 1.86 (tt, *J* = 8.4, 5.1 Hz, 1H), 1.04 – 0.81 (m, 2H), 0.77 – 0.66 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 170.3, 159.7, 155.8, 148.7, 141.4, 128.5, 107.5, 105.0, 97.7, 14.0, 7.7.

#### 5.2.6.5. *N*-(4-Aminophenyl)-*N*-(5-cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)pyrimidin-2,4-diamin (**200**)



Zinn(II)-chlorid-Dihydrat (2.95 g, 13.1 mmol, 3.0 eq.) wird in 12 mL Essigsäure suspendiert und 5 mL konz. HCl werden zugegeben. Nitroverbindung **198** (1.47 g, 4.36 mmol, 1.0 eq.) wird zugegeben und die Reaktionsmischung wird für 5 h bei 80 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Mischung auf RT abgekühlt, der gebildete Feststoff wird abgefiltert, in Wasser gelöst und die Lösung wird mit Natriumhydroxid auf pH 10 eingestellt. Es wird mit AcOEt (3x 30 mL extrahiert), die vereinigten organischen Extrakte werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Amin **200** wird als hellgelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 940 mg (3.06 mmol, 70%).

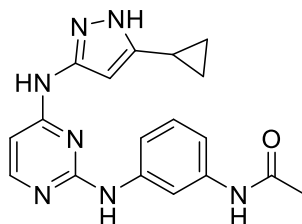
**Molmasse:** [C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>]: 307.36 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 11.92 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.1 Hz, 3H), 6.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.43 – 6.01 (m, 2H), 4.73 (s, 2H), 1.85 (dq, *J* = 8.9, 5.1, 4.4 Hz, 1H), 0.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 0.81 – 0.52 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 160.3, 159.6, 155.8, 148.3, 145.3, 143.5, 130.0, 121.9, 113.9, 96.9, 92.9, 7.7, 6.8.

**5.2.6.6. *N*-(3-((4-((5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-acetamid (201, BSc5300)**



Amin **199** (129 mg, 0.42 mmol, 1.0 eq.) wird in 15 mL AcOEt bei 0 °C vorgelegt, Essigsäureanhydrid (97.4  $\mu$ L, 0.84 mmol, 2.0 eq.) wird zugetropft und das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird der gebildete Feststoff abgefiltert und der Feststoff im Vakuum getrocknet. **BSc5300 (201)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 78 mg (0.18 mmol, 52%).

**Molmasse:** [C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O]: 349.40 g/mol.

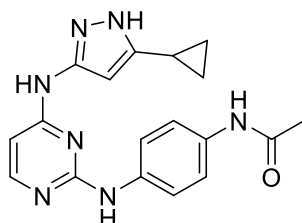
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.22 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm 11.99 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 9.44 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 9.35 – 8.90 (m, 1H), 8.00 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.95 – 7.72 (m, 1H), 7.59 – 7.38 (m, 1H), 7.30 – 6.94 (m, 2H), 6.38 (s, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.86 (tt, *J* = 8.4, 5.0 Hz, 1H), 0.91 (dq, *J* = 6.4, 4.0 Hz, 2H), 0.80 – 0.63 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 168.1, 159.5, 155.7, 141.1, 139.4, 128.3, 114.3, 112.3, 110.1, 98.3, 59.7, 24.0, 20.7, 14.1, 8.5, 7.6.

**MS (ESI):** *m/z* = 350.18 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.6.7. *N*-(4-((4-((5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-acetamid (202, BSc5303)**



Amin **200** (200 mg, 0.651 mmol, 1.0 eq.) wird in 15 mL trockenem THF bei 0 °C vorgelegt, Pyridin (58  $\mu$ L, 56.6 mg, 0.716 mmol, 1.1 eq.) und Essigsäureanhydrid (68  $\mu$ L, 0.716 mmol, 1.0 eq.) werden zugetropft und das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1). **BSc5303 (202)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 124 mg (0.355 mmol, 55%).

**Molmasse:** [C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O]: 349.40 g/mol.

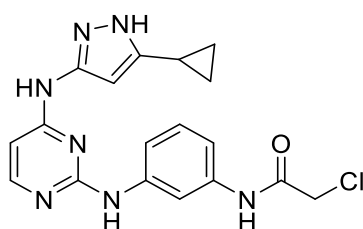
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.17 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 12.05 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.72 – 7.59 (m, 2H), 7.55 – 7.42 (m, 2H), 6.38 (s, 1H), 6.08 (s, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.87 (tt, *J* = 8.4, 5.1 Hz, 1H), 0.98 – 0.82 (m, 2H), 0.76 – 0.59 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 167.7, 159.6, 159.5, 155.9, 155.8, 136.2, 133.1, 119.3, 97.8, 59.7, 54.9, 23.8, 21.0, 20.7, 14.1, 7.7.

**MS (ESI):** *m/z* = 350.18 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 5.2.6.8. 2-Chlor-*N*-(3-((4-((5-cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)acetamid (203, BSc5306)



Amin **199** (200 mg, 0.651 mmol, 1.0 eq.) und Triethylamin (99 μL, 72.5 mg, 0.716 mmol, 1.1 eq.) werden in 5 mL trockenem THF vorgelegt und 2-Chloracetylchlorid (57 μL, 80.9 mg, 0.716 mmol, 1.1 eq.) in 2 mL trockenem THF wird zugegeben. Es wird für eine Stunde bei RT gerührt und anschließend wird erneut Triethylamin (36 μL, 0.26 mmol, 0.4 eq.) und 2-Chloracetylchlorid (21 μL, 0.26 mmol, 0.4 eq.) zugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Nach beendeter Reaktion wird ges. aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (15 mL) und ges. aq. NaCl-Lösung (15 mL) zugegeben und es wird mit AcOEt (40 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1). **BSc5306 (203)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 100 mg (0.261 mmol, 40%).

**Molmasse:** [C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>7</sub>O]: 383.84 g/mol.

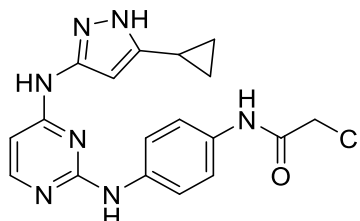
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.33 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 11.97 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 9.48 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 71.4 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.23 (q, *J* = 11.5, 8.0 Hz, 2H), 6.38 (d, *J* = 67.1 Hz, 2H), 4.27 (s, 2H), 1.87 (tt, *J* = 8.5, 5.1 Hz, 1H), 0.92 (s, 2H), 0.78 – 0.58 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 164.4, 159.5, 155.6, 148.2, 145.4, 141.3, 138.5, 128.5, 115.2, 112.5, 110.6, 98.4, 93.0, 43.6, 7.6, 6.9.

**MS (ESI):** *m/z* = 384.14 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 5.2.6.9. 2-Chlor-*N*-(4-((4-((5-cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)acetamid (204, BSc5307)



Amin **200** (200 mg, 0.651 mmol, 1.0 eq.) und Triethylamin (99  $\mu$ L, 72.5 mg, 0.716 mmol, 1.1 eq.) werden in 5 mL trockenem THF vorgelegt und 2-Chloracetylchlorid (57  $\mu$ L, 80.9 mg, 0.716 mmol, 1.1 eq.) in 2 mL trockenem THF wird zugegeben. Es wird über Nacht bei RT gerührt und nach beendeter Reaktion wird ges. aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (15 mL) und ges. aq. NaCl-Lösung (15 mL) zugegeben und es wird mit AcOEt (40 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1). **BSc5307 (204)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 95 mg (0.248 mmol, 38%).

**Molmasse:** [C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>7</sub>O]: 383.84 g/mol.

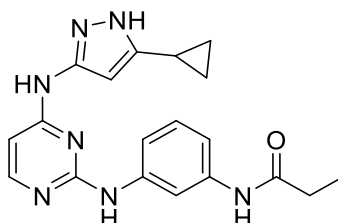
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.29 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 12.00 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.11 – 7.85 (m, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.56 – 7.47 (m, 2H), 6.47 (d, *J* = 25.5 Hz, 1H), 6.33 – 6.11 (m, 1H), 4.24 (s, 2H), 1.87 (tt, *J* = 8.5, 5.1 Hz, 1H), 0.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 0.69 (tt, *J* = 6.9, 4.4 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 164.0, 159.4, 155.6, 136.96, 132.0, 119.7, 97.9, 43.6, 7.7.

**MS (ESI):** *m/z* = 384.14 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 5.2.6.10. *N*-(3-((4-((5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)propionamid (205, BSc5301)



Amin **199** (200 mg, 0.651 mmol, 1.0 eq.) wird in 15 mL trockenem THF bei 0 °C vorgelegt, Pyridin (63  $\mu$ L, 62.0 mg, 0.781 mmol, 1.2 eq.) und Propionsäureanhydrid (100  $\mu$ L, 102 mg, 0.781 mmol, 1.2 eq.) werden zugetropft und das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in AcOEt (30 mL) aufgenommen und mit Wasser (30 mL) gewaschen. Die

organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 0 bis 10%). **BSc5301 (205)** wird als gelber amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 111 mg (0.305 mmol, 47%).

**Molmasse:** [C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>7</sub>O]: 363.43 g/mol.

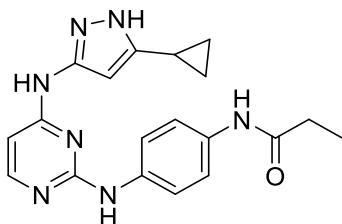
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.30 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 11.97 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.59 – 7.38 (m, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.17 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.37 (s, 2H), 2.34 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.86 (tt, *J* = 8.4, 5.0 Hz, 1H), 1.10 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 0.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 0.74 – 0.64 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 171.8, 155.6, 141.1, 139.4, 128.3, 112.4, 98.2, 54.9, 40.0, 39.9, 39.7, 39.5, 39.4, 39.2, 39.0, 29.5, 9.7, 7.6.

**MS (ESI):** *m/z* = 364.10 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 5.2.6.11. *N*-(4-((4-((5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)propionamid (**206**, BSc5304)



Amin **200** (200 mg, 0.651 mmol, 1.0 eq.) wird in 15 mL trockenem THF bei 0 °C vorgelegt, Pyridin (58 µL, 56.6 mg, 0.716 mmol, 1.1 eq.) und Propionsäureanhydrid (91 µL, 93.2 mg, 0.716 mmol, 1.1 eq.) werden zugetropft und das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in AcOEt (30 mL) aufgenommen und mit Wasser (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 0 bis 10%). **BSc5304 (206)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 104 mg (0.286 mmol, 40%).

**Molmasse:** [C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>7</sub>O]: 363.43 g/mol.

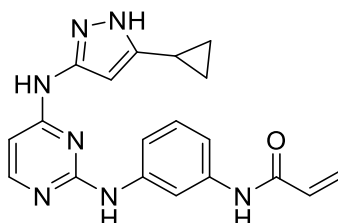
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.13 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 12.17 (s, 1H), 10.00 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 9.82 (s, 1H), 9.41 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 7.57 (s, 4H), 6.42 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 2.33 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.86 (tt, *J* = 8.4, 5.0 Hz, 1H), 1.11 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.99 – 0.86 (m, 2H), 0.65 (dt, *J* = 6.6, 3.2 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 171.5, 159.5, 157.7, 134.4, 120.9, 119.3, 98.1, 51.4, 29.5, 28.7, 28.5, 28.4, 9.8, 7.7, 7.1.

MS (ESI): *m/z* = 364.20 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.6.12. *N*-(3-((4-((5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)acrylamid (207, BSc5302)**



Amin **199** (200 mg, 0.651 mmol, 1.0 eq.) wird in 15 mL trockenem THF bei 0 °C vorgelegt, Pyridin (58 µL, 56.6 mg, 0.716 mmol, 1.1 eq.) und Acryloylchlorid (59 µL, 64.8 mg, 0.716 mmol, 1.1 eq.) werden zugetropft und das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0 °C und 18 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in AcOEt (30 mL) aufgenommen. Die organische Phase wird mit ges. aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (15 mL) und ges. aq. NaCl- Lösung (15 mL) gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1). **BSc5302 (207)** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 62 mg (0.171 mmol, 26%).

**Molmasse:** [C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O]: 361.41 g/mol.

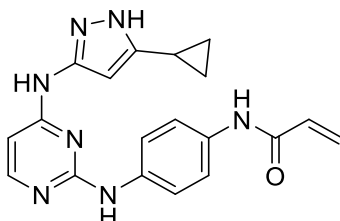
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.15 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 11.97 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 9.46 (d, *J* = 68.4 Hz, 1H), 9.35 – 9.00 (m, 1H), 8.10 – 7.88 (m, 3H), 7.50 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.21 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.50 (dd, *J* = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.27 (dd, *J* = 16.9, 2.0 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J* = 10.2, 2.1 Hz, 1H), 1.86 (tt, *J* = 8.4, 5.1 Hz, 1H), 0.90 (tt, *J* = 9.3, 5.4 Hz, 2H), 0.78 – 0.59 (m, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 163.0, 159.4, 141.1, 139.1, 132.1, 128.5, 126.5, 112.7, 98.3, 7.6.

MS (ESI): *m/z* = 362.18 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.6.13. *N*-(4-((4-((5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)acrylamid (208, BSc5305)**



Amin **200** (200 mg, 0.651 mmol, 1.0 eq.) wird in 15 mL trockenem THF bei 0 °C vorgelegt, Pyridin (58  $\mu$ L, 56.6 mg, 0.716 mmol, 1.1 eq.) und Acryloylchlorid (59  $\mu$ L, 64.8 mg, 0.716 mmol, 1.1 eq.) werden zugetropft und das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 10:1$ ). **BSc5305 (208)** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 30 mg (0.083 mmol, 13%).

**Molmasse:**  $[\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}]$ : 361.41 g/mol.

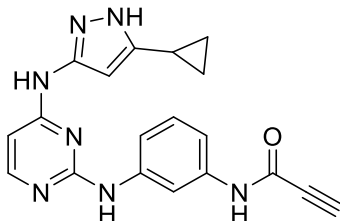
**$R_f$ -Wert:** 0.17 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 10:1$ ).

**$^1\text{H}$ -NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 11.99$  (s, 1H), 10.02 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 7.98 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.64 – 7.53 (m, 2H), 6.45 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.25 (dd,  $J = 17.0, 2.1$  Hz, 1H), 5.73 (dd,  $J = 10.2, 2.0$  Hz, 1H), 1.87 (tt,  $J = 8.4, 5.0$  Hz, 1H), 0.99 – 0.86 (m, 2H), 0.76 – 0.63 (m, 2H).

**$^{13}\text{C}$ -NMR** (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 162.6, 159.5, 155.9, 136.7, 132.6, 132.1, 126.1, 119.6, 119.3, 97.9, 14.1, 7.7$ .

**MS (ESI):**  $m/z = 362.18$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**5.2.6.14. *N*-(3-((4-((5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)propiolamid (209, BSc5314)**



Amin **199** (200 mg, 0.651 mmol, 1.0 eq.) wird in 5 mL trockenem DMF bei 0 °C vorgelegt, DIPEA (233  $\mu$ L, 177 mg, 1.37 mmol, 2.1 eq.), Propiolsäure (241  $\mu$ L, 273 mg, 3.90 mmol, 6.0 eq.) und EDAC·HCl (263 mg, 1.37 mmol, 2.1 eq.) werden zugegeben und das Reaktionsgemisch wird 2 h bei 0 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird die Reaktionsmischung mit AcOEt (30 mL) verdünnt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Das Rohprodukt wird säulen-chromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 10:1$ ). **BSc5314 (209)** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 12 mg (0.033 mmol, 5%).

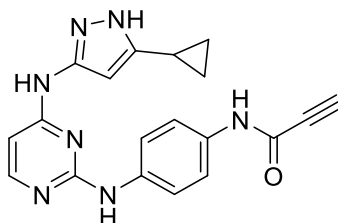
**Molmasse:** [C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O]: 359.39 g/mol.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 11.99 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 7.97 (s, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.55 – 7.45 (m, 2H), 6.56 – 6.08 (m, 2H), 4.34 (s, 1H), 1.87 (tt, *J* = 8.5, 5.1 Hz, 1H), 0.93 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 0.74 – 0.65 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 159.9, 157.1, 153.5, 146.7, 135.0, 129.3, 117.6, 116.7, 116.7, 95.5, 76.2, 74.2, 5.3.

**MS (ESI):** *m/z* = 360.15 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 5.2.6.15. *N*-(4-((4-((5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)propiolamid (**210**, BSc5313)



Amin **200** (130 mg, 0.420 mmol, 1.0 eq.) wird in 10 mL trockenem DMF bei 0 °C vorgelegt, DIPEA (150 μL, 114 mg, 0.882 mmol, 2.1 eq.), Propiolsäure (156 μL, 177 mg, 2.52 mmol, 6.0 eq.) und EDAC·HCl (169 mg, 0.882 mmol, 2.1 eq.) werden zugegeben und das Reaktionsgemisch wird 2 h bei 0 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird die Reaktionsmischung mit AcOEt (30 mL) verdünnt und mit 0.1 N aq. HCl-Lösung und 0.1 N aq. NaOH-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1). **BSc5313 (210)** wird als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 26 mg (0.072 mmol, 17%).

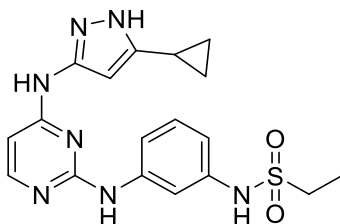
**Molmasse:** [C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O]: 359.39 g/mol.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 11.97 (s, 1H), 10.71 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 9.06 (d, *J* = 39.8 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 39.2 Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.21 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 6.56 – 6.16 (m, 2H), 4.37 (s, 1H), 1.86 (tt, *J* = 8.4, 5.0 Hz, 1H), 0.96 – 0.85 (m, 2H), 0.74 – 0.64 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 159.5, 155.5, 149.5, 141.2, 138.2, 128.5, 113.0, 98.3, 78.5, 76.8, 56.0, 18.5, 7.6.

**MS (ESI):** *m/z* = 360.16 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.6.16. *N*-(3-((4-((5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)ethansulfonamid (211, BSc5309)**



Amin **199** (200 mg, 0.651 mmol, 1.0 eq.) und Triethylamin (180  $\mu$ L, 132 mg, 1.30 mmol, 2.0 eq.) werden in 10 mL trockenem THF vorgelegt und Ethansulfonylchlorid (123  $\mu$ L, 167 mg, 1.30 mmol, 2.0 eq.) wird zugegeben. Es wird 1 h bei RT und 1 h bei 60 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird die Reaktionsmischung auf RT abgekühlt, mit AcOEt verdünnt und mit ges. aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (15 mL) und ges. aq. NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1). **BSc5309 (211)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 81 mg (0.203 mmol, 31%).

**Molmasse:** [C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S]: 399.47 g/mol.

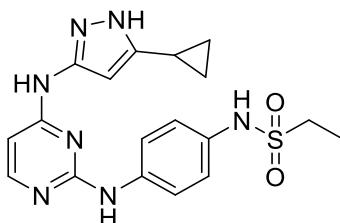
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.43 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 11.98 (s, 1H), 9.63 (s, 1H), 9.41 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.69 – 7.44 (m, 2H), 7.20 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.86 – 6.74 (m, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 3.12 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.94 – 1.84 (m, 1H), 1.23 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.98 – 0.85 (m, 2H), 0.71 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 159.7, 159.5, 155.8, 148.1, 145.4, 141.8, 138.5, 128.9, 114.8, 112.4, 110.6, 98.4, 93.05, 54.9, 45.0, 7.99, 7.7, 6.8.

**MS (ESI):** *m/z* = 400.16 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.6.17. *N*-(4-((4-((5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)ethansulfonamid (212, BSc5310)**



Amin **200** (200 mg, 0.651 mmol, 1.0 eq.) und Triethylamin (180  $\mu$ L, 132 mg, 1.30 mmol, 2.0 eq.) werden in 10 mL trockenem THF vorgelegt und Ethansulfonylchlorid (123  $\mu$ L, 167 mg, 1.30 mmol, 2.0 eq.) wird zugegeben. Es wird 1 h bei RT und 1 h bei 60 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird die Reaktionsmischung auf RT abgekühlt, mit AcOEt verdünnt und mit ges. aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (15 mL) und ges. aq. NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen. Die

organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1). **BSc5310 (212)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 102 mg (0.256 mmol, 39%).

**Molmasse:** [C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S]: 399.47 g/mol.

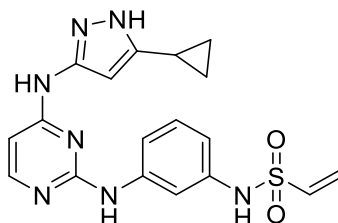
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.26 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 11.99 (s, 1H), 9.46 (s, 2H), 9.02 (s, 1H), 8.13 – 7.91 (m, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.49 (d, *J* = 39.7 Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 3.03 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.88 (dq, *J* = 8.8, 5.0, 4.3 Hz, 1H), 1.23 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.00 – 0.86 (m, 2H), 0.77 – 0.64 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 159.5, 155.9, 148.1, 145.5, 137.7, 131.2, 121.3, 119.8, 98.0, 93.0, 54.9, 44.6, 8.0, 7.7, 6.8.

**MS (ESI):** *m/z* = 400.16 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 5.2.6.18. *N*-(3-((4-((5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)ethansulfonamid (**213**, BSc5311)



Amin **199** (200 mg, 0.651 mmol, 1.0 eq.) und Triethylamin (180 μL, 132 mg, 1.30 mmol, 2.0 eq.) werden in 10 mL trockenem THF bei 0 °C vorgelegt und 2-Chlorethansulfonylchlorid (123 μL, 167 mg, 1.30 mmol, 2.0 eq.) wird zugegeben. Es wird 1 h bei 0 °C gerührt, weiteres Triethylamin (90 μL, 66 mg, 0.651 mmol, 1.0 eq.) wird zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird die Reaktionsmischung mit AcOEt verdünnt und mit ges. aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (15 mL) und ges. aq. NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 100:1 bis 10/1). **BSc5311 (213)** wird als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 40 mg (0.101 mmol, 15%).

**Molmasse:** [C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S]: 397.46 g/mol.

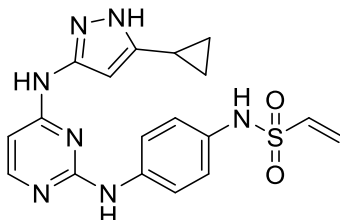
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 11.98 (s, 1H), 9.88 (d, *J* = 45.6 Hz, 1H), 9.50 (d, *J* = 85.1 Hz, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.13 – 7.93 (m, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.16 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.84 – 6.77 (m, 1H), 6.76 – 6.71 (m, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 6.18 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 6.06 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 1.88 (s, 1H), 0.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 0.70 (t, *J* = 13.8 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 161.0, 156.9, 149.4, 146.7, 143.0, 139.1, 137.6, 130.0, 128.8, 116.1, 113.7, 112.0, 99.8, 94.4, 56.2, 9.0, 8.1.

MS (ESI): *m/z* = 398.15 [M+H]<sup>+</sup>.

**5.2.6.19. *N*-(4-((4-((5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)ethansulfonamid (214, BSc5312)**



Amin **200** (220 mg, 0.716 mmol, 1.0 eq.) und Triethylamin (119 µL, 87 mg, 0.859 mmol, 1.2 eq.) werden in 10 mL trockenem THF bei 0 °C vorgelegt und 2-Chlorethansulfonylchlorid (90 µL, 140 mg, 0.859 mmol, 1.2 eq.) wird zugegeben. Es wird 18 h bei RT gerührt, weiteres Triethylamin (198 µL, 148 mg, 1.43 mmol, 2.0 eq.) und 2-Chlorethynsulfonylchlorid (75 µL, 117 mg, 0.720 mmol, 1.0 eq.) werden zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird die Reaktionsmischung mit AcOEt verdünnt und mit ges. aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (15 mL) und ges. aq. NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1). **BSc5312 (214)** wird als gelber amorpher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 24 mg (0.060 mmol, 9%).

**Molmasse:** [C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S]: 397.46 g/mol.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.22 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ/ppm = 7.82 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.52 – 7.39 (m, 2H), 7.09 – 7.00 (m, 2H), 6.56 (dd, *J* = 16.5, 10.0 Hz, 1H), 6.17 (s, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.83 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 1.79 (tt, *J* = 8.5, 5.1 Hz, 1H), 0.91 – 0.76 (m, 2H), 0.61 (dq, *J* = 9.0, 3.4, 2.6 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ/ppm = 161.2, 156.9, 139.0, 137.2, 132.9, 127.7, 123.7, 123.0, 122.0, 117.4, 99.0, 8.3.

MS (ESI): *m/z* = 398.15 [M+H]<sup>+</sup>.

### 5.2.7. Bestimmung der Reinheit der getesteten Substanzen mittels HPLC

**Tabelle 13:** Reinheiten der synthetisierten Verbindungen, ermittelt durch HPLC-Experimente.

Verbindung	t <sub>R</sub> / min	Reinheit / %	Detektor	λ / nm	Projekt
BSc5321 <sup>1</sup>	9.062	98.0256	VWD	254	cCP
BSc5322 <sup>1</sup>	9.906	97.8340	VWD	205	cCP
BSc5323 <sup>1</sup>	9.225	97.8486	VWD	205	cCP
BSc5324	9.266	99.1150	VWD	254	cCP
BSc5325	9.118	99.0789	VWD	254	cCP
BSc5326	9.052	97.5287	VWD	254	cCP
BSc5327	8.267	98.5202	VWD	254	cCP
BSc5328	9.472	97.3843	VWD	254	cCP
BSc5356	9.006	98.4421	VWD	254	cCP
BSc5357	8.977	97.8081	VWD	254	cCP
BSc5358	9.090	98.0169	VWD	254	cCP
BSc5359	9.127	97.8065	VWD	254	cCP
BSc5360	9.093	96.1759	VWD	254	cCP
BSc5372	4.967	97.8043	VWD	254	cCP
BSc5373	7.198	97.8479	VWD	205	cCP
BSc5374	4.619	98.9923	VWD	254	cCP
BSc5375	8.430	97.5408	VWD	254	cCP
BSc5376	9.273	99.0460	VWD	254	cCP
BSc5377	9.492	99.2761	VWD	254	cCP
BSc5378	8.636	97.4556	VWD	254	cCP
BSc5379	9.337	97.8595	VWD	254	cCP
BSc5380	7.529	96.6261	VWD	205	cCP
BSc5390	10.589	99.2857	VWD	360	cCP
BSc5391	10.204	99.4795	VWD	360	cCP
BSc5392	10.159	98.5419	VWD	360	cCP
BSc5427 <sup>2</sup>	5.859	98.0720	VWD	205	iCP
BSc5428 <sup>2</sup>	5.741	98.2031	VWD	205	iCP
BSc5429	7.193	99.1614	VWD	254	iCP
BSc5430	7.206	98.9057	VWD	254	iCP
BSc5431	7.993	96.1523	VWD	254	iCP
BSc5432	7.995	96.5076	VWD	254	iCP
BSc5433	8.309	98.4965	VWD	254	iCP
BSc5434	8.323	98.0529	VWD	254	iCP

<sup>1</sup>Substanz durch Janika Steinbacher<sup>[121]</sup> bereitgestellt; <sup>2</sup>Substanz durch Felix Krusch<sup>[138]</sup> bereitgestellt.

**Tabelle 14:** Reinheiten der synthetisierten Verbindungen, ermittelt durch HPLC-Experimente.

Verbindung	t <sub>R</sub> / min	Reinheit / %	Detektor	λ / nm	Projekt
BSc5300	1,514	95,6875	VWD	254	FLT3
BSc5301	1,922	96,0849	VWD	254	FLT3
BSc5302	1,933	95,0714	VWD	254	FLT3
BSc5303	1,352	98,1651	VWD	254	FLT3
BSc5304	1,674	95,2979	VWD	254	FLT3
BSc5305	1,703	96,9724	VWD	254	FLT3
BSc5306	2,180	97,3103	VWD	254	FLT3
BSc5307	1,949	97,8748	VWD	254	FLT3
BSc5309	2,142	96,4205	VWD	254	FLT3
BSc5310	1,966	95,4217	VWD	254	FLT3
BSc5311	2,261	97,3760	VWD	254	FLT3
BSc5312	2,131	97,6470	VWD	254	FLT3
BSc5313	1,692	99,0749	VWD	254	FLT3
BSc5314	1,854	97,5080	VWD	254	FLT3

---

### 5.3. Pharmakologische Charakterisierung der Inhibitoren durch biochemische Methoden

#### 5.3.1. Vorbereitung der verwendeten Inhibitoren

Aus den dargestellten Inhibitoren werden 10 mM *Stock*-Lösungen in DMSO hergestellt, indem ungefähr 5 mg Substanz exakt eingewogen werden. Anschließend wird mit der entsprechenden Menge DMSO versetzt, für 30 min im Ultraschallbad homogenisiert und zuletzt zentrifugiert, um auszuschließen, dass ungelöster Feststoff vorliegt. Die Lagerung erfolgt bei -28 °C. Die Identität und Stabilität der Substanzen wird regelmäßig mittels HPLC überprüft. Carfilzomib (MedChemExpress) wurde als 10 mM Lösung in DMSO kommerziell erworben. Bortezomib (Selleckchem) wurde kommerziell als Feststoff bezogen und entsprechend der obigen Angaben in DMSO für die Herstellung einer 10 mM Lösung verwendet.

#### 5.3.2. Zelllinien

Humane Leukämie-Zelllinien wurden in Form von MV4-11-Zellen (ACC102) kommerziell bei der DSMZ erworben oder durch Prof. Dr. Katja Schmitz bereitgestellt (THP-1 (ACC16) und Jurkat (ACC282)). Die Suspensionszellen werden in RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich) mit 10% FBS, L-Glutamin (2 mM), Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen werden bei einer Dichte von 0.25 bis 1.5 x 10<sup>6</sup> Zellen / ml in Suspension kultiviert und alle 48 h bis 72 h, im Verhältnis von 1 zu 2 bis 1 zu 6, in frischem Medium aufgeteilt.

#### 5.3.3. Bestimmung der zeitabhängigen Zellviabilität

Zur Bestimmung der zeitabhängigen zytotoxischen Wirkung von **Carfilzomib** und **BSc5376** in MV4-11-, Jurkat- und THP1-Zellen werden die Zellen bei einer Dichte von 0.5 bis 1.5 x 10<sup>6</sup> Zellen / ml in RPMI-1640-Medium mit 0.1% FBS resuspendiert und in einer 384-well Platte ausgesät (2.000 Zellen / well, 27 µL). Die Zellen werden mit Inhibitor (5 µM, 500 nM, 250 nM, 50 nM, 25 nM, 5 nM, 2.5 nM und 0.5 nM) oder DMSO (0.1%) behandelt und anschließend mit dem RealTime-Glo MT Reagenz (Promega, 30 µl) für 18 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Chemolumineszenz wird nach 3.5 h, 5.5 h, 7.0 h, 8.0 h, 9.0 h, 10.5 h, 11.5 h, 12.5 h, 13.5 h, 14.5 h, 15.5 h, 16.5 h und 17.5 h Inkubationszeit gemessen (500 ms Integrationszeit). Die relative Anzahl der lebenden Zellen wird durch das Verhältnis der Fluoreszenz der behandelten- und unbehandelten Zellen angegeben, wobei die Negativkontrolle (nur Medium) abgezogen wird. Die relative Inhibition des Zellüberlebens wird gegen die logarithmische Konzentration des Inhibitors aufgetragen und der IC<sub>50</sub>-Wert durch einen Fit der Messwerte an die Gleichung  $Y = 100 / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$  bestimmt (GraphPad Prism 7.02, San Diego, CA, USA). Die so erhaltenen Dosis-Wirkungskurven sind in Abschnitt 5.3.4. dargestellt.

#### 5.3.4. Bestimmung der Inhibition von insoliertem Proteasom

Für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der verwendeten Inhibitoren des Proteasoms wird das 20S Proteasom Assay Kit (Enzo Life Sciences) verwendet. Die Aktivität der β5-Untereinheiten des Immuno- und konstitutiven Proteasoms wird mit dem fluorogenen

Substratpeptid Suc-LLVY-AMC durchgeführt. Für die  $\beta 1c$  und  $\beta 2c$  Untereinheiten werden die Substratpeptide Z-LLG-AMC bzw. Bz-VGR-AMZ verwendet. Die Messungen werden als technische Duplikate vorgenommen, wobei die angegebenen Inhibitionswerte den Mittelwert von Triplikaten darstellen. Die Inhibitoren werden aus den 10 mM Vorratslösungen in DMSO zur Testung der inhibitorischen Aktivität in Proteasom Assay-Puffer (Enzo Life Sciences, 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 25 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Diese werden zum Proteasom (200 ng / well) gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wird das Substrat zugegeben (100  $\mu$ M Endkonzentration) und die entstehende Fluoreszenz (Exc. = 360 nm, Em. = 460 nm) für 60 min bei RT in einem Tecan M1000 Mikrotiterplatten-Lesegerät detektiert. Die relative Inhibition ergibt sich aus dem Verhältnis der Steigung der Fluoreszenz des mit und ohne Inhibitor inkubierten Proteasoms, wobei jeweils die Steigung der Negativkontrolle subtrahiert wird. Zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte werden die relativen Inhibitionswerte der Proteasomaktivität gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen und an eine Gleichung der Formel " $Y=100/(1+10^{((\text{LogIC}_{50}-X)*\text{HillSlope}))}$ " angepasst (GraphPad Prism 7.02, San Diego, CA, USA). Die so erhaltenen Dosis-Wirkungskurven sind in Abschnitt 5.3.4. dargestellt.

### 5.3.5. Bestimmung der zellulären Inhibition des Proteasoms

Die Bestimmung der Inhibition des zellulären Umsatzes des fluorogenen Substrats **BSc5098** erfolgt mit 25.000 Zellen pro well (60  $\mu$ L) in RPMI-1640-Medium, das mit 0.1% FBS versetzt ist. Die Inhibitoren werden in einer Verdünnungsreihe in RPMI-1640-Medium mit 0.1% FBS in der 10-fachen der finalen Konzentration vorgelegt, 10  $\mu$ L werden auf die Zellen gegeben und es wird für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Es werden 30  $\mu$ L einer 100  $\mu$ M-Lösung von **BSc5098** in RMP-1640 Medium zu jedem well gegeben, für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und die Substratumsetzung für 60 min bei 37°C an einem Tecan M1000 Mikrotiterplatten-Lesegerät durch Detektion der resultierenden Fluoreszenz bestimmt (Exc. 360 nm, Em. 460 nm). Die Rate der Fluoreszenz-Entwicklung wird berechnet und die relative Inhibition für jede Konzentration ergibt sich im Verhältnis zur Positivkontrolle ohne Inhibitor, wobei jeweils die Fluoreszenz der Negativkontrolle abgezogen wird. Die finalen Inhibitor-Konzentrationen sind auf das Endvolumen bezogen (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 500 nM, 182 nM, 91 nM, 33.3 nM, 17 nM). Die angegebenen Wirkstoffkonzentrationen der halbmaximalen Inhibition sind der Mittelwert technischer Triplikate und die Messwerte werden den Fit an eine Kurve der Gleichung " $Y=100/(1+10^{((\text{LogIC}_{50}-X)*\text{HillSlope}))}$ " mit GraphPad Prism 7.02, San Diego, CA, USA, bestimmt.

### 5.3.6. Durchführung des Zebrafisch-Embryonen-Toxizitätsassays

Adulte Zebrafische (*Danio rerio*, Wildtyp) werden in 60 L Aquarien, die mit Pflanzenbewuchs, Aquariumpumpen, Luftpumpen für eine bessere Sauerstoffversorgung und einem Sandbett ausgestattet sind, in einem Labor ohne Tageslicht gehalten. In dem Raum, der konstant auf 28 °C klimatisiert ist, ist das Licht auf einen 12 h Tag / 12 h Nacht Rhythmus eingestellt. Für die Paarung werden adulte Zebrafische abends in Zuchtbecken mit einem Volumen von 1 L (2 Tiere / 1 L Wasser) oder speziellen Zuchtaquarien mit einem Volumen von 20 L (6 – 8 Tiere / 20 L Wasser) überführt. Diese speziellen Zuchtbecken sind mit Aquariumpumpen, Kunststoffpflanzen und entfernbaren Sieben am Boden ausgestattet. Die adulten Tiere werden



---

am Folgetag, 2 – 3 Stunden nach Beginn des Tag-Zyklus, zurück in die Aquarien gesetzt und die gelegten Eier werden gesammelt, mit E3-Medium gewaschen, und in Petrischalen mit E3-Medium überführt. Ein Tag nach der Befruchtung (1 dpf) werden die Embryonen unter der Stereolupe analysiert und die lebenden Embryonen, die an der Ausbildung und Differenzierung des Chorions erkennbar sind, in 96-well Platten (1 Embryo / well) oder 24-well Platten (10 Embryonen / well) transferiert.

Die zu testenden Substanzen werden aus den entsprechenden 10 mM Stock-Lösungen auf das 10-fache der finalen Konzentration in E3-Medium verdünnt und auf ungelösten Feststoff untersucht. Die Embryonen werden nach 1 dpf in 180  $\mu$ L E3-Medium (96-well Platten) oder 450  $\mu$ L E3-Medium (24-well Platten) überführt und es werden 20  $\mu$ L bzw. 50  $\mu$ L der 10x-Inhibitor-Lösung zugegeben wodurch die finale Testkonzentration erreicht wird. Das Überleben der Embryonen wird alle 24 h durch Analyse des Herzschlags festgestellt und die Überlebensraten werden auf die mit 0.1% DMSO-behandelten Kontroll-Embryonen bezogen. Die Aufnahme der Bilder erfolgt mit einer Panasonic Lumix GX8 Kamera, die mit einem Lumix G Makro Objektiv (1:2.8 / 30 ASPH) und einem 10 mm sowie einem 16 mm Extender-Ring ausgestattet ist. Die Analyse der Fluoreszenz nach Inkubation von *Danio rerio* Embryonen mit den fluoreszenten Proteasominhibitoren **BSc5390** – **BSc5392** erfolgt mit einem AxioScope.A1 Mikroskop (Zeiss) und die entsprechenden Bilder werden mit einem multispektralen Nuance FX Detektor (Cambridge Research & Instrumentation, Woburn, MA) aufgenommen.

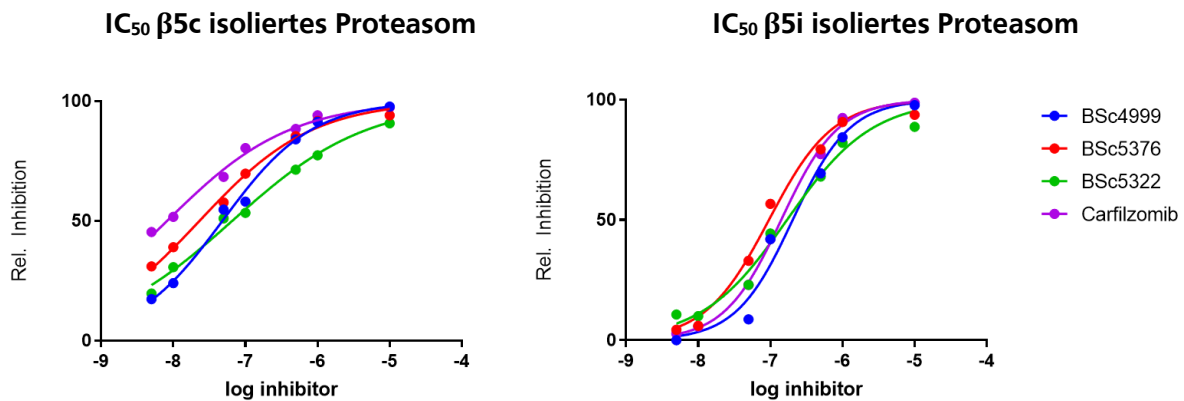
Die Versuchstierhaltung ist von der Wissenschaftsstadt Darmstadt gemäß dem Tierschutzgesetz und der Tierschutz-Versuchstierverordnung genehmigt. Sämtliche Fische werden ethisch behandelt und die Anzahl der in den Versuchen untersuchten Embryonen wird so gering wie möglich gehalten. Die Embryonen, die in den beschriebenen Experimenten untersucht werden, werden spätestens 120 hpf (5 dpf), noch vor Beginn der selbstständigen Nahrungsaufnahme, mit Eugenol euthanasiert.

### 5.3.7. Bestimmung der Inhibition der Kinaseaktivität durch BSc5311

Die Inhibition weiterer Kinasen durch **BSc5311** wird durch die Bestimmung der Restaktivitäten verschiedener Kinasen in der KinaseProfiler Plattform durch Eurofins Pharma Discovery Services (Dundee, United Kingdom) ermittelt. Die Experimente werden in einem enzymatisch-radiometrischen Assay mit 10  $\mu$ M ATP  $\gamma$ - $^{33}$ P durchgeführt, wobei die Kinasereaktion durch das entstehende  $^{33}$ P-markierte Substrat mit einem Szintillationsdetektor quantifiziert wird. Die relative Inhibition wird als Verhältnis der Zerfallsvorgänge nach Zugabe von Inhibitor und der Positivkontrolle ohne Inhibitor berechnet.

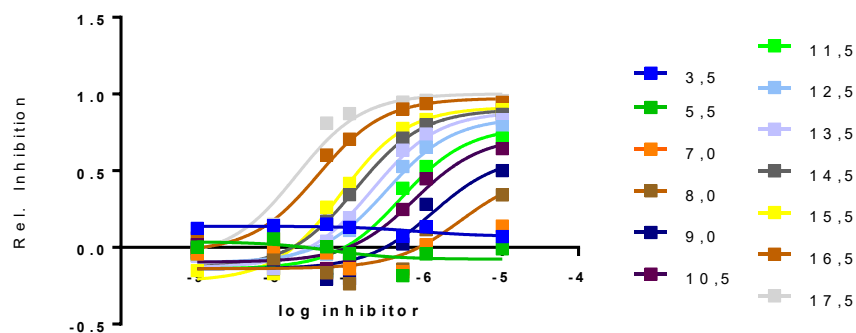
### 5.3.8. Dosis-Wirkungskurven

#### 5.3.8.1. IC<sub>50</sub>-Bestimmung der Inhibition des isolierten Proteasoms

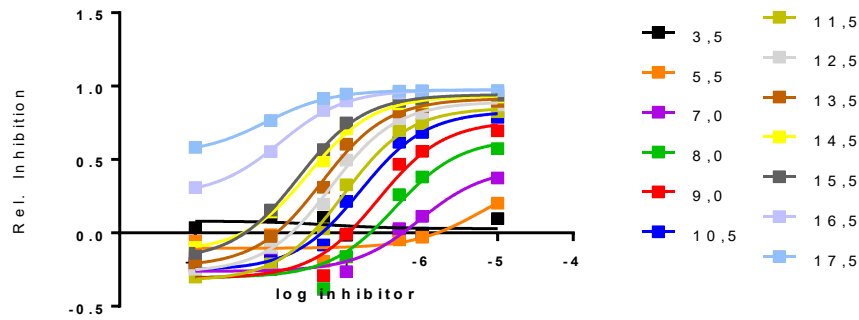


**Abbildung 47:** Dosis-Wirkungskurven für die Inhibition der β5c- und der β5i-Untereinheit durch die wichtigsten Verbindungen.

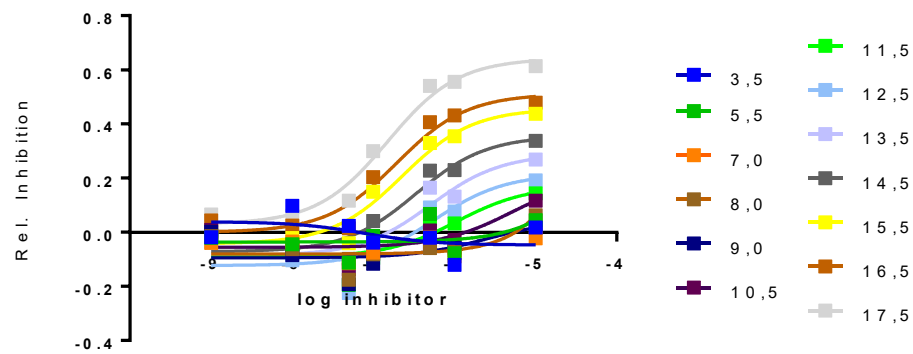
#### 5.3.8.2. Zeitabhängige Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Proteasom-inhibitoren in verschiedenen Zelllinien



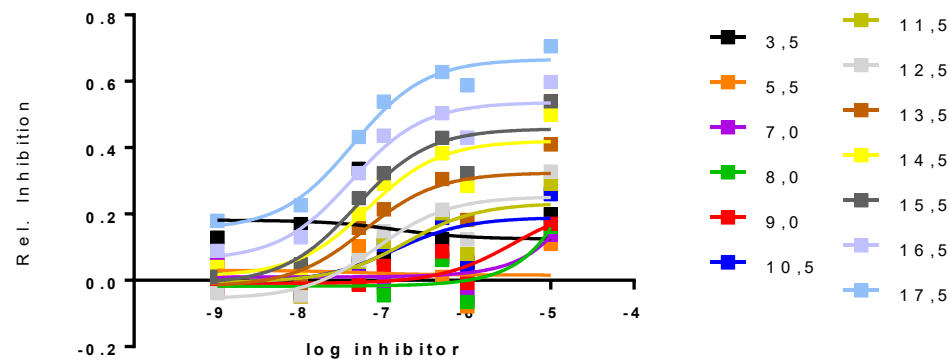
**Abbildung 48:** Dosis-Wirkungskurven für die kontinuierliche Bestimmung der zytotoxischen Aktivität in MV4-11-Zellen durch BSc5376 über 17.5 h.



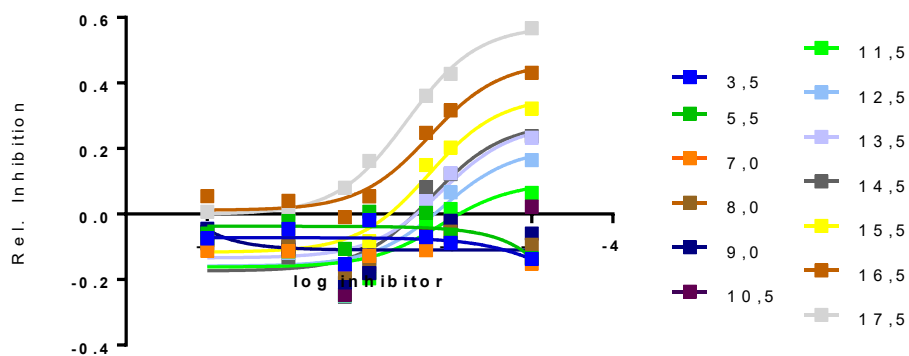
**Abbildung 49:** Dosis-Wirkungskurven für die kontinuierliche Bestimmung der zytotoxischen Aktivität in MV4-11-Zellen durch Carfilzomib über 17,5 h.



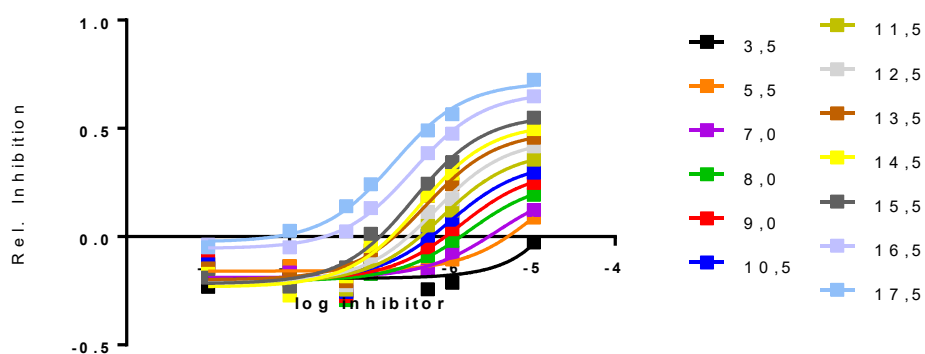
**Abbildung 50:** Dosis-Wirkungskurven für die kontinuierliche Bestimmung der zytotoxischen Aktivität in THP1 Zellen durch BSc5376 über 17,5 h.



**Abbildung 51:** Dosis-Wirkungskurven für die kontinuierliche Bestimmung der zytotoxischen Aktivität in THP1 Zellen durch Carfilzomib über 17,5 h.



**Abbildung 52:** Dosis-Wirkungskurven für die kontinuierliche Bestimmung der zytotoxischen Aktivität in Jurkat Zellen durch **BSc5376** über 17.5 h.



**Abbildung 53:** Dosis-Wirkungskurven für die kontinuierliche Bestimmung der zytotoxischen Aktivität in Jurkat Zellen durch **Carfilzomib** über 17.5 h.

**Tabelle 15:** Vergleich der zeitabhängigen Zytotoxizität ( $IC_{50}$ ) und der relativen  $IC_{50}$ -Werte in MV4-11-, THP-1- und Jurkat-Zellen durch **BSc5376** und **Carfilzomib** über 17.5 h.

Zeit / h	MV4-11			Jurkat			THP-1		
	$IC_{50}$ / nM BSc5376	$IC_{50}$ / nM Cfz	Verhältnis $IC_{50}$ -Werte	$IC_{50}$ / nM BSc5376	$IC_{50}$ / nM Cfz	Verhältnis $IC_{50}$ -Werte	$IC_{50}$ / nM BSc5376	$IC_{50}$ / nM Cfz	Verhältnis $IC_{50}$ -Werte
3.5					1.61E-02				
5.5		5.89E-06			1.06E-05				
7		9.44E-07			3.46E-06			1.16E-02	
8	2.85E-06	4.37E-07	6.5		1.61E-06		1.99E-03	8.41E-03	0.2
9	1.25E-06	2.63E-07	4.8		1.28E-06		2.43E-06	3.56E-06	0.7
10.5	7.15E-07	1.54E-07	4.7		9.54E-07		4.96E-06	1.34E-07	37.0
11.5	4.78E-07	9.25E-08	5.2	7.67E-07	7.51E-07	1.0	1.07E-06	1.82E-07	5.8
12.5	3.08E-07	6.21E-08	5.0	8.05E-07	6.15E-07	1.3	5.70E-07	8.19E-08	7.0
13.5	1.99E-07	4.67E-08	4.3	7.80E-07	4.73E-07	1.6	5.09E-07	5.91E-08	8.6
14.5	1.21E-07	3.15E-08	3.9	5.80E-07	4.01E-07	1.4	3.35E-07	6.34E-08	5.3
15.5	7.63E-08	2.34E-08	3.3	5.40E-07	3.33E-07	1.6	2.26E-07	4.61E-08	4.9
16.5	3.84E-08	1.33E-08	2.9	5.53E-07	3.28E-07	1.7	1.94E-07	4.01E-08	4.8
17.5	2.00E-08	8.67E-09	2.3	2.94E-07	1.93E-07	1.5	1.51E-07	4.24E-08	3.6

### 5.3.9. Charakterisierung fluoreszenter Proteasom-Inhibitoren

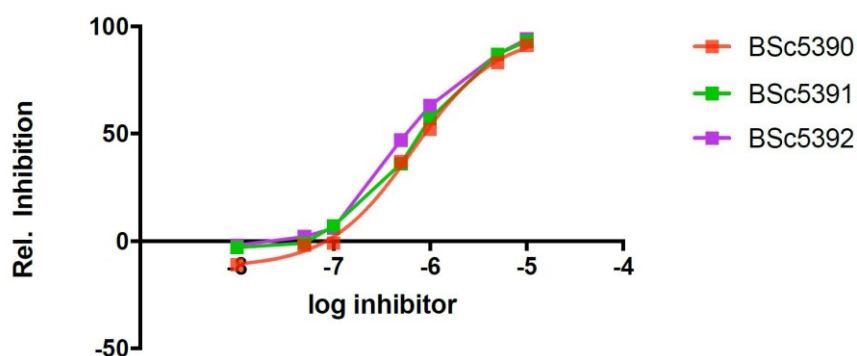


Abbildung 54: Dosis-Wirkungskurven der Inhibition der zellulären Umsetzung des Substratpeptids BSc5098 durch die fluoreszenten Proteasominhibitoren BSc5390 – BSc5392.

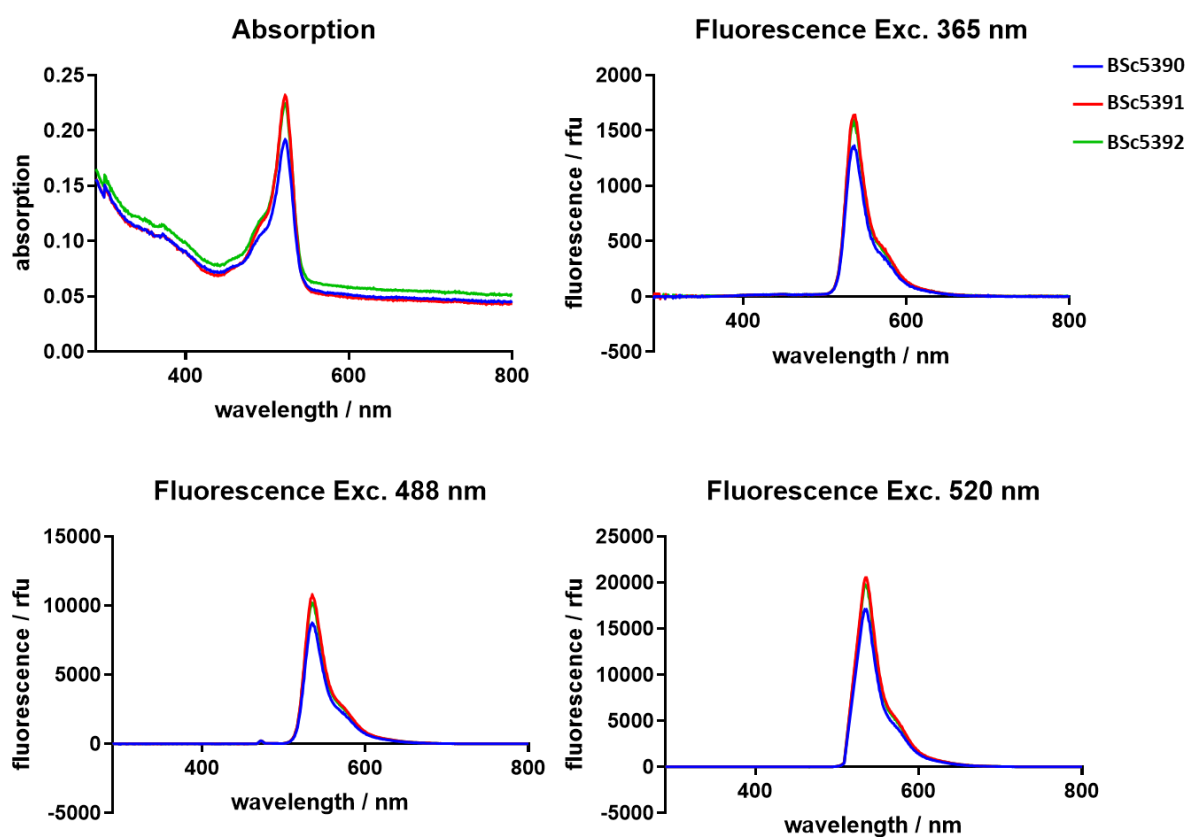
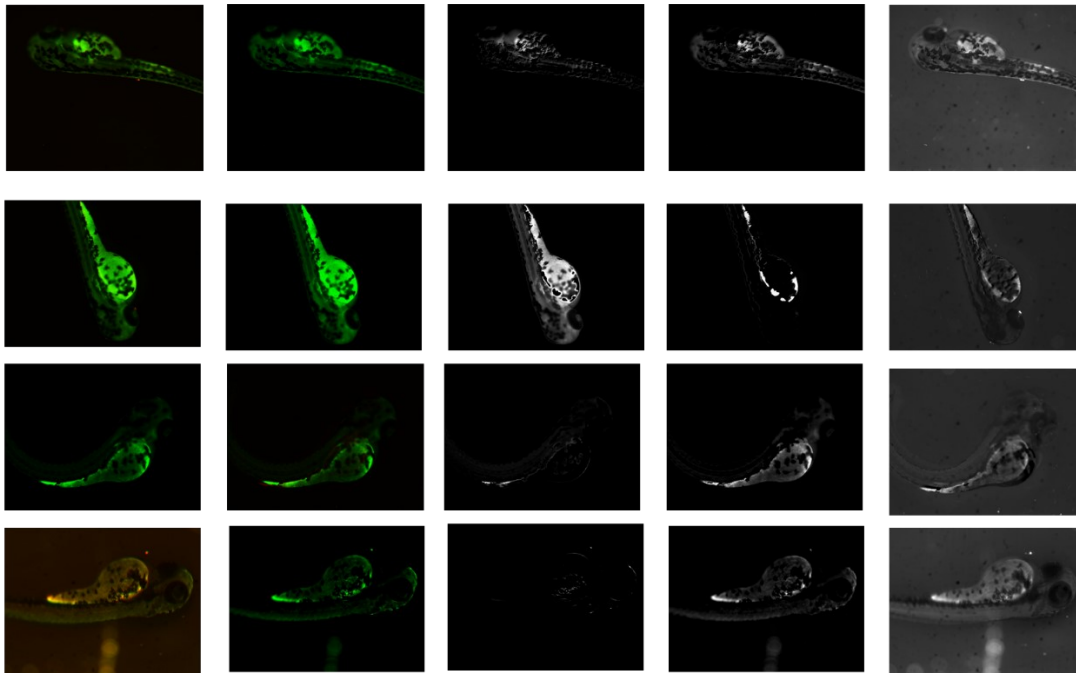


Abbildung 55: Absorptions- und Fluoreszenz-Emissionsspektren der Verbindungen BSc5390 – BSc5392.



**Abbildung 56:** Visualisierung von *Danio rerio* Embryos, die mit den BODIPY-konjugierten Fluorophoren **BSc5390** (1. Reihe), **BSc5391** (2. Reihe) und **BSc5392** (3. Reihe) behandelt wurden und Kontroll-Embryo (unterste Reihe). Die Bilder wurden mit einem Nuance Fx Imaging System (3225.5 ms Belichtungszeit, Filter AF488, 5x Vergrößerung) aufgenommen. Linke Spalte: RGB Aufnahme; 2. Spalte: neu zusammengesetztes Bild nach multispektraler Analyse; 3. Spalte: Signal 1; 4. Spalte: Signal 2; rechte Spalte: Hintergrundsignal.

---

## Literaturverzeichnis

---

- [1] D. Ohlendorf, *Zentralblatt für Arbeitsmedizin, Arbeitsschutz und Ergonomie* **2016**, 66, 214-215.
- [2] P. Kaatsch, C. Spix, A. Katalini, S. Hentschel, S. Luttmann, C. Stegmaier, M. Waldeyer-Sauerland, A. Waldmann, S. Caspritz, M. Christ, A. Ernst, J. Folkerts, J. Hansmann, S. Klein, K. Kranzhöfer, B. Kunz, K. Manegold, A. Penzkofer, K. Treml, S. Weg-Remers, K. Wittenberg, B. Barnes, J. Bertz, N. Buttman-Schweiger, S. Dahm, J. Fiebig, J. Haberland, K. Kraywinkel, A. Wienecke, U. Wolf, *Krebs in Deutschland | 2013/2014* **2017**.
- [3] R. Raynes, L. C. D. Pomatto, K. J. A. Davies, *Mol. Aspects Med.* **2016**, 50, 41-55.
- [4] P. M. Cromm, C. M. Crews, *ACS Cent. Sci.* **2017**, 3, 830-838.
- [5] A. Rentsch, D. Landsberg, T. Brodmann, L. Bülow, A.-K. Girbig, M. Kalesse, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 5560-5599.
- [6] L. Borissenko, M. Groll, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 687-717.
- [7] K. Nasmyth, *Annu. Rev. Genet.* **2001**, 35, 673-745.
- [8] M. Scheffner, J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra, P. M. Howley, *Cell* **1993**, 75, 495-505.
- [9] R. Honda, H. Tanaka, H. Yasuda, *FEBS Letters* **1997**, 420, 25-27.
- [10] E. Krüger, P.-M. Kloetzel, *Curr. Opin. Immunol.* **2012**, 24, 77-83.
- [11] U. Seifert, L. P. Bialy, F. Ebstein, D. Bech-Otschir, A. Voigt, F. Schröter, T. Prozorovski, N. Lange, J. Steffen, M. Rieger, U. Kuckelkorn, O. Aktas, P.-M. Kloetzel, E. Krüger, *Cell* **2010**, 142, 613-624.
- [12] C. L. Ward, S. Omura, R. R. Kopito, *Cell* **1995**, 83, 121-127.
- [13] T. Ugo, *Curr. Drug Targets* **2009**, 10, 968-981.
- [14] E. M. Huber, M. Groll, *BIOSpektrum* **2013**, 19, 730-732.
- [15] G. de Bruin, E. M. Huber, B.-T. Xin, E. J. van Rooden, K. Al-Ayed, K.-B. Kim, A. F. Kisselev, C. Driessen, M. van der Stelt, G. A. van der Marel, M. Groll, H. S. Overkleeft, *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 6197-6209.
- [16] M. Biel, V. Wascholowski, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6414-6416.
- [17] M. Karin, Y. Ben-Neriah, *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, 18, 621-663.
- [18] O. Coux, K. Tanaka, A. L. Goldberg, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 801-847.
- [19] S. Bhattacharyya, H. Yu, C. Mim, A. Matouschek, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, 15, 122-133.
- [20] M. Rechsteiner, C. P. Hill, *Trends Cell Biol.* **2005**, 15, 27-33.
- [21] E. Kish-Trier, C. P. Hill, *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, 42, 29-49.
- [22] Alexei F. Kisselev, W. A. van der Linden, Herman S. Overkleeft, *Chem. Biol.* **2012**, 19, 99-115.
- [23] A. Kniepert, M. Groettrup, *Trends in Biochem. Sci.* **2014**, 39, 17-24.
- [24] L. Gómez-H, N. Felipe-Medina, Y. B. Condezo, R. Garcia-Valiente, I. Ramos, J. A. Suja, J. L. Barbero, I. Roig, M. Sánchez-Martín, D. G. de Rooij, E. Llano, A. M. Pendas, *PLoS Genet.* **2019**, 15, e1008316.
- [25] C. Dubiella, R. Baur, H. Cui, E. M. Huber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 15888-15891.
- [26] Eva M. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, Christopher J. Kirk, M. Groettrup, M. Groll, *Cell* **2012**, 148, 727-738.
- [27] D. Bensinger, T. Neumann, C. Scholz, C. Voss, S. Knorr, U. Kuckelkorn, K. Hamacher, P.-M. Kloetzel, B. Schmidt, *ACS Chem. Biol.* **2016**, 11, 1800-1804.
- [28] A. K. Nussbaum, T. P. Dick, W. Keilholz, M. Schirle, S. Stevanović, K. Dietz, W. Heinemeyer, M. Groll, D. H. Wolf, R. Huber, H. G. Rammensee, H. Schild, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1998**, 95, 12504-12509.
- [29] D. A. Ferrington, D. S. Gregerson, in *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **2012**, 109, 75-112.
- [30] A. Angeles, G. Fung, H. Luo, *Front. Biosci., Landmark Ed.* **2012**, 17, 1904-1916.

- [31] M. Desjardins, *EMBO J.* **2019**, *38*, e102799.
- [32] B.-T. Xin, G. de Bruin, E. M. Huber, A. Besse, B. I. Florea, D. V. Filippov, G. A. van der Marel, A. F. Kisselev, M. van der Stelt, C. Driessen, M. Groll, H. S. Overkleeft, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 7177-7187.
- [33] T. Muchamuel, M. Basler, M. A. Aujay, E. Suzuki, K. W. Kalim, C. Lauer, C. Sylvain, E. R. Ring, J. Shields, J. Jiang, P. Shwonek, F. Parlati, S. D. Demo, M. K. Bennett, C. J. Kirk, M. Groettrup, *Nat. Med.* **2009**, *15*, 781-787.
- [34] M. Basler, S. Mundt, T. Muchamuel, C. Moll, J. Jiang, M. Groettrup, C. J. Kirk, *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 226-238.
- [35] M. Basler, M. Dajee, C. Moll, M. Groettrup, C. J. Kirk, *J. Immunol.* **2010**, *185*, 634-641.
- [36] H. T. Ichikawa, T. Conley, T. Muchamuel, J. Jiang, S. Lee, T. Owen, J. Barnard, S. Nevarez, B. I. Goldman, C. J. Kirk, R. J. Looney, J. H. Anolik, *Arthritis Rheum.* **2012**, *64*, 493-503.
- [37] Y. K. Ho, P. Bargagna-Mohan, M. Wehenkel, R. Mohan, K.-B. Kim, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 419-430.
- [38] M. Basler, S. Mundt, A. Bitzer, C. Schmidt, M. Groettrup, *Clin. Exp. Rheumatol.* **2015**, *33*, S74-79.
- [39] M. Diaz-Hernandez, F. Hernandez, E. Martin-Aparicio, P. Gomez-Ramos, M. A. Moran, J. G. Castano, I. Ferrer, J. Avila, J. J. Lucas, *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 11653-11661.
- [40] C. M. Ethen, S. A. Hussong, C. Reilly, X. Feng, T. W. Olsen, D. A. Ferrington, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 885-890.
- [41] M. Mishto, E. Bellavista, A. Santoro, A. Stolzing, C. Ligorio, B. Nacmias, L. Spazzafumo, M. Chiappelli, F. Licastro, S. Sorbi, A. Pession, T. Ohm, T. Grune, C. Franceschi, *Neurobiol. Aging* **2006**, *27*, 54-66.
- [42] M. Altun, P. J. Galaray, R. Shringarpure, T. Hideshima, R. LeBlanc, K. C. Anderson, H. L. Ploegh, B. M. Kessler, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 7896-7901.
- [43] L. Woojin, K. Kyung Bo, *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2923-2930.
- [44] M. L. Stein, M. Groll, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **2014**, *1843*, 26-38.
- [45] M. Groll, K. B. Kim, N. Kairies, R. Huber, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1237-1238.
- [46] D. P. Lane, *Nature* **1992**, *358*, 15-16.
- [47] I. Nickleit, S. Zender, F. Sasse, R. Geffers, G. Brandes, I. Sörensen, H. Steinmetz, S. Kubicka, T. Carlomagno, D. Menche, I. Gütgemann, J. Buer, A. Gossler, M. P. Manns, M. Kalesse, R. Frank, N. P. Malek, *Cancer Cell* **2008**, *14*, 23-35.
- [48] A. Arlt, I. Bauer, C. Schafmayer, J. Tepel, S. S. Muerköster, M. Brosch, C. Röder, H. Kalthoff, J. Hampe, M. P. Moyer, U. R. Fölsch, H. Schäfer, *Oncogene* **2009**, *28*, 3983-3996.
- [49] J. Lowe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, *268*, 533-539.
- [50] E. Seemuller, A. Lupas, D. Stock, J. Lowe, R. Huber, W. Baumeister, *Science* **1995**, *268*, 579-582.
- [51] H. A. Braun, S. Umbreen, M. Groll, U. Kuckelkorn, I. Mlynarczuk, M. E. Wigand, I. Drung, P.-M. Kloetzel, B. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28394-28401.
- [52] E. Shaw, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **1990**, 271-347.
- [53] S. Arastu-Kapur, J. L. Anderl, M. Kraus, F. Parlati, K. D. Shenk, S. J. Lee, T. Muchamuel, M. K. Bennett, C. Driessen, A. J. Ball, C. J. Kirk, *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2734-2743.
- [54] J. E. Park, Z. Miller, Y. Jun, W. Lee, K. B. Kim, *Transl. Res.* **2018**, *198*, 1-16.
- [55] E. A. Zaal, W. Wu, G. Jansen, S. Zweegman, J. Cloos, C. R. Berkers, *Cancer Metab.* **2017**, *5*, 7-7.



- [56] P. Moreau, T. Masszi, N. Grzasko, N. J. Bahlis, M. Hansson, L. Pour, I. Sandhu, P. Ganly, B. W. Baker, S. R. Jackson, A. M. Stoppa, D. R. Simpson, P. Gimsing, A. Palumbo, L. Garderet, M. Cavo, S. Kumar, C. Touzeau, F. K. Buadi, J. P. Laubach, D. T. Berg, J. Lin, A. Di Bacco, A. M. Hui, H. van de Velde, P. G. Richardson, *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1621-1634.
- [57] H. Avet-Loiseau, N. J. Bahlis, W. J. Chng, T. Masszi, L. Viterbo, L. Pour, P. Ganly, A. Palumbo, M. Cavo, C. Langer, A. Pluta, A. Nagler, S. Kumar, D. Ben-Yehuda, S. V. Rajkumar, J. San-Miguel, D. Berg, J. Lin, H. van de Velde, D. L. Esseltine, A. di Bacco, P. Moreau, P. G. Richardson, *Blood* **2017**, *130*, 2610-2618.
- [58] M. Offidani, L. Corvatta, P. Caraffa, S. Gentili, L. Maracci, P. Leoni, *Onco. Targets Ther.* **2014**, *7*, 1793-1800.
- [59] M. Shirley, *Drugs* **2016**, *76*, 405-411.
- [60] S. Pacifico, V. Ferretti, V. Albanese, A. Fantinati, E. Gallerani, F. Nicoli, R. Gavioli, F. Zamberlan, D. Preti, M. Marastoni, *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1086-1092.
- [61] M. L. Stein, H. Cui, P. Beck, C. Dubiella, C. Voss, A. Krüger, B. Schmidt, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1679-1683.
- [62] P. Moreau, *Expert Rev. Hematol.* **2014**, *7*, 265-290.
- [63] J. Schrader, F. Henneberg, R. A. Mata, K. Tittmann, T. R. Schneider, H. Stark, G. Bourenkov, A. Chari, *Science* **2016**, *353*, 594-598.
- [64] M. A. Gräwert, N. Gallastegui, M. Stein, B. Schmidt, P. M. Kloetzel, R. Huber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 542-544.
- [65] S. Chatterjee, D. Dunn, S. Mallaya, M. A. Ator, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2603-2606.
- [66] C. Voss, C. Scholz, S. Knorr, P. Beck, M. L. Stein, A. Zall, U. Kuckelkorn, P.-M. Kloetzel, M. Groll, K. Hamacher, B. Schmidt, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2557-2564.
- [67] C. De Risi, G. P. Pollini, V. Zanirato, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3241-3305.
- [68] E. Elert, *Nature* **2013**, *504*, S2-S3.
- [69] H. Austin, E. Delzell, P. Cole, *Am. J. Epidemiol.* **1988**, *127*, 419-439.
- [70] T. Radivoyevitch, R. K. Sachs, R. P. Gale, R. J. Molenaar, D. J. Brenner, B. T. Hill, M. E. Kalaycio, H. E. Carraway, S. Mukherjee, M. A. Sekeres, J. P. Maciejewski, *Leukemia* **2016**, *30*, 285-294.
- [71] U. Creutzig, J. Ritter, J. Vormoor, W. D. Ludwig, C. Niemeyer, I. Reinisch, B. Stollmann-Gibbels, M. Zimmermann, J. Harbott, *Leukemia* **1996**, *10*, 1677-1686.
- [72] F. D. Malone, J. A. Canick, R. H. Ball, D. A. Nyberg, C. H. Comstock, R. Bukowski, R. L. Berkowitz, S. J. Gross, L. Dugoff, S. D. Craig, I. E. Timor-Tritsch, S. R. Carr, H. M. Wolfe, K. Dukes, D. W. Bianchi, A. R. Rudnicka, A. K. Hackshaw, G. Lambert-Messerlian, N. J. Wald, M. E. D'Alton, *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 2001-2011.
- [73] K. R. Kampen, *Leuk Res* **2012**, *36*, 6-13.
- [74] A. Cumano, I. Godin, *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25*, 745-785.
- [75] E. Laurenti, B. Gottgens, *Nature* **2018**, *553*, 418-426.
- [76] U. Creutzig, M. M. van den Heuvel-Eibrink, B. Gibson, M. N. Dworzak, S. Adachi, E. de Bont, J. Harbott, H. Hasle, D. Johnston, A. Kinoshita, T. Lehrnbecher, G. Leverger, E. Mejstrikova, S. Meshinchi, A. Pession, S. C. Raimondi, L. Sung, J. Stary, C. M. Zwaan, G. J. L. Kaspers, D. Reinhardt, *Blood* **2012**, *120*, 3187-3205.
- [77] R. M. Stone, M. R. O'Donnell, M. A. Sekeres, *Hematology, Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2004**, 98-117.
- [78] T. Kindler, D. B. Lipka, T. Fischer, *Blood* **2010**, *116*, 5089-5102.
- [79] A. Renneville, C. Roumier, V. Biggio, O. Nibourel, N. Boissel, P. Fenaux, C. Preudhomme, *Leukemia* **2008**, *22*, 915-931.
- [80] I. De Kouchkovsky, M. Abdul-Hay, *Blood Cancer J* **2016**, *6*, e441.
- [81] T. Grafone, M. Palmisano, C. Nicci, S. Storti, *Oncol. Rev.* **2012**, *6*, e8.
- [82] N. Daver, R. F. Schlenk, N. H. Russell, M. J. Levis, *Leukemia* **2019**, *33*, 299-312.
- [83] H. Dombret, C. Gardin, *Blood* **2016**, *127*, 53-61.

- 
- [84] D. Gewirtz, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 57, 727-741.
- [85] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, *Pharmacol. Rev.* **2004**, 56, 185-229.
- [86] E. H. Estey, *Oncology (Williston Park)* **2002**, 16, 343-352, 355-346; discussion 357, 362, 365-346.
- [87] K. J. Norsworthy, C.-W. Ko, J. E. Lee, J. Liu, C. S. John, D. Przepiorka, A. T. Farrell, R. Pazdur, *Oncologist* **2018**, 23, 1103-1108.
- [88] E. C. Attar, D. J. De Angelo, A. Sirulnik, M. Wadleigh, K. K. Ballen, K. B. Miller, I. Galinsky, D. Neuberg, E. Trehu, D. Schenkein, R. M. Stone, P. C. Amrein, *Blood* **2005**, 106, 2782-2782.
- [89] C. M. Csizmar, D. H. Kim, Z. Sachs, *Blood Cancer J* **2016**, 6, e503-e503.
- [90] C. Larrue, E. Saland, H. Boutzen, F. Vergez, M. David, C. Joffre, M. A. Hospital, J. Tamburini, E. Delabesse, S. Manenti, J. E. Sarry, C. Recher, *Blood* **2016**, 127, 882-892.
- [91] A. Hochhaus, T. Lahaye, S. Kreil, U. Berger, G. Metzgeroth, R. Hehlmann, *Oncol. Res. Treat.* **2001**, 24, 65-71.
- [92] D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavec, H. J. Roth, *Medizinische Chemie: Targets - Arzneistoffe - chemische Biologie ; 191 Tabellen*, Dt. Apotheker-Verlag, **2010**.
- [93] J. Griffith, J. Black, C. Faerman, L. Swenson, M. Wynn, F. Lu, J. Lippke, K. Saxena, *Mol Cell* **2004**, 13, 169-178.
- [94] S. Takahashi, *J. Hematol. Oncol.* **2011**, 4, 13.
- [95] S. R. H. and, J. H. Till, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 373-398.
- [96] D. Bossemeyer, *FEBS Letters* **1995**, 369, 57-61.
- [97] N. Maroc, R. Rottapel, O. Rosnet, S. Marchetto, C. Lavezzi, P. Mannoni, D. Birnbaum, P. Dubreuil, *Oncogene* **1993**, 8, 909-918.
- [98] M. Levis, D. Small, *Leukemia* **2003**, 17, 1738-1752.
- [99] F. M. Abu-Duhier, A. C. Goodeve, G. A. Wilson, M. A. Gari, I. R. Peake, D. C. Rees, E. A. Vandenberghe, P. R. Winship, J. T. Reilly, *Br. J. Haematol.* **2000**, 111, 190-195.
- [100] D. G. Gilliland, J. D. Griffin, *Blood* **2002**, 100, 1532-1542.
- [101] S. M. Wilhelm, C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, C. Chen, X. Zhang, P. Vincent, M. McHugh, Y. Cao, J. Shujath, S. Gawlak, D. Eveleigh, B. Rowley, L. Liu, L. Adnane, M. Lynch, D. Auclair, I. Taylor, R. Gedrich, A. Voznesensky, B. Riedl, L. E. Post, G. Bollag, P. A. Trail, *Cancer Res.* **2004**, 64, 7099-7109.
- [102] G. L. Uy, S. J. Mandrekar, K. Laumann, G. Marcucci, W. Zhao, M. J. Levis, H. D. Klepin, M. R. Baer, B. L. Powell, P. Westervelt, D. J. DeAngelo, W. Stock, B. Sanford, W. G. Blum, C. D. Bloomfield, R. M. Stone, R. A. Larson, *Blood Adv.* **2017**, 1, 331-340.
- [103] E. P. Rock, V. Goodman, J. X. Jiang, K. Mahjoob, S. L. Verbois, D. Morse, R. Dagher, R. Justice, R. Pazdur, *Oncologist* **2007**, 12, 107-113.
- [104] L. Sun, C. Liang, S. Shirazian, Y. Zhou, T. Miller, J. Cui, J. Y. Fukuda, J. Y. Chu, A. Nematalla, X. Wang, H. Chen, A. Sistla, T. C. Luu, F. Tang, J. Wei, C. Tang, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1116-1119.
- [105] T. F. Chu, M. A. Rupnick, R. Kerkela, S. M. Dallabrida, D. Zurakowski, L. Nguyen, K. Woulfe, E. Pravda, F. Cassiola, J. Desai, S. George, J. A. Morgan, D. M. Harris, N. S. Ismail, J. H. Chen, F. J. Schoen, A. D. Van den Abbeele, G. D. Demetri, T. Force, M. H. Chen, *Lancet* **2007**, 370, 2011-2019.
- [106] R. M. Stone, S. J. Mandrekar, B. L. Sanford, K. Laumann, S. Geyer, C. D. Bloomfield, C. Thiede, T. W. Prior, K. Dohner, G. Marcucci, F. Lo-Coco, R. B. Klisovic, A. Wei, J. Sierra, M. A. Sanz, J. M. Brandwein, T. de Witte, D. Niederwieser, F. R. Appelbaum, B. C. Medeiros, M. S. Tallman, J. Krauter, R. F. Schlenk, A. Ganser, H. Serve, G. Ehninger, S. Amadori, R. A. Larson, H. Dohner, *N. Engl. J. Med.* **2017**, 377, 454-464.
- [107] A.-M. O'Farrell, T. J. Abrams, H. A. Yuen, T. J. Ngai, S. G. Louie, K. W. H. Yee, L. M. Wong, W. Hong, L. B. Lee, A. Town, B. D. Smolich, W. C. Manning, L. J. Murray, M. C. Heinrich, J. M. Cherrington, *Blood* **2003**, 101, 3597-3605.

- [108] T. Fischer, R. M. Stone, D. J. Deangelo, I. Galinsky, E. Estey, C. Lanza, E. Fox, G. Ehninger, E. J. Feldman, G. J. Schiller, V. M. Klimek, S. D. Nimer, D. G. Gilliland, C. Dutreix, A. Huntsman-Labed, J. Virkus, F. J. Giles, *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 4339-4345.
- [109] S. A. Wander, M. J. Levis, A. T. Fathi, *Ther. Adv. Hematol.* **2014**, *5*, 65-77.
- [110] J. A. Zorn, Q. Wang, E. Fujimura, T. Barros, J. Kuriyan, *PLoS One* **2015**, *10*, e0121177.
- [111] C. C. Smith, E. A. Lasater, K. C. Lin, Q. Wang, M. Q. McCreery, W. K. Stewart, L. E. Damon, A. E. Perl, G. R. Jeschke, M. Sugita, M. Carroll, S. C. Kogan, J. Kuriyan, N. P. Shah, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2014**, *111*, 5319-5324.
- [112] M. Wu, C. Li, X. Zhu, *J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 133.
- [113] K. Pratz, M. Cherry, J. K. Altman, B. W. Cooper, J. C. Cruz, J. G. Jurcic, M. J. Levis, T. L. Lin, A. E. Perl, N. A. Podoltsev, G. J. Schiller, C. Liu, E. Bahceci, *Blood* **2017**, *130*, 722-722.
- [114] R. Lonsdale, R. A. Ward, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 3816-3830.
- [115] R. A. Bauer, *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 1061-1073.
- [116] K. S. Bhullar, N. O. Lagaron, E. M. McGowan, I. Parmar, A. Jha, B. P. Hubbard, H. P. V. Rupasinghe, *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 48.
- [117] A. Chaikuad, P. Koch, S. A. Laufer, S. Knapp, *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 4456-4470.
- [118] A. Schirmer, J. Kennedy, S. Murli, R. Reid, D. V. Santi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2006**, *103*, 4234-4239.
- [119] E. Ogorevc, E. S. Schiffrer, I. Sosič, S. Gobec, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2018**, *28*, 517-540.
- [120] D. Bensinger, Dissertation, Technische Universität Darmstadt, **2019**.
- [121] J. Steinbacher, Master Thesis, Technische Universität Darmstadt, **2017**.
- [122] M. Passerini, *Gazz. Chim. Ital.* **1921**, *51*, 181.
- [123] A. Dömling, I. Ugi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168-3210.
- [124] S. Maeda, S. Komagawa, M. Uchiyama, K. Morokuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 644-649.
- [125] J. Brioché, G. Masson, J. Zhu, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1432-1435.
- [126] P. R. Andreana, C. C. Liu, S. L. Schreiber, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4231-4233.
- [127] K. Aradi, B. L. Tóth, G. L. Tolnai, Z. Novák, *Synlett* **2016**, *27*, 1456-1485.
- [128] N. Micale, R. Ettari, A. Lavecchia, C. Di Giovanni, K. Scarbaci, V. Troiano, S. Grasso, E. Novellino, T. Schirmeister, M. Zappalà, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 23-34.
- [129] A. Rouette, A. Trofimov, D. Haberl, G. Boucher, V.-P. Lavallée, G. D'Angelo, J. Hébert, G. Sauvageau, S. Lemieux, C. Perreault, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34019.
- [130] A. Busse, M. Kraus, I.-K. Na, A. Rietz, C. Scheibenbogen, C. Driessen, I. W. Blau, E. Thiel, U. Keilholz, *Cancer* **2008**, *112*, 659-670.
- [131] C. Scholz, S. Knorr, K. Hamacher, B. Schmidt, *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 398-406.
- [132] C. Voss, Dissertation thesis, (Darmstadt), **2014**.
- [133] M. Verdoes, B. I. Florea, V. Menendez-Benito, C. J. Maynard, M. D. Witte, W. A. van der Linden, A. M. C. H. van den Nieuwendijk, T. Hofmann, C. R. Berkers, F. W. B. van Leeuwen, T. A. Groothuis, M. A. Leeuwenburgh, H. Ova, J. J. Neefjes, D. V. Filippov, G. A. van der Marel, N. P. Dantuma, H. S. Overkleeft, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1217-1226.
- [134] Z. Dost, S. Atilgan, E. U. Akkaya, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8484-8488.
- [135] L. Catley, E. Weisberg, T. Kiziltepe, Y.-T. Tai, T. Hideshima, P. Neri, P. Tassone, P. Atadja, D. Chauhan, N. C. Munshi, K. C. Anderson, *Blood* **2006**, *108*, 3441-3449.
- [136] I. Mlynarczuk-Bialy, T. R. Doepfner, J. Golab, D. Nowis, G. M. Wilczynski, K. Parobczak, M. E. Wigand, M. Hajdamowicz, Ł. P. Biały, O. Aniolek, P. Henklein, M. Bähr, B. Schmidt, U. Kuckelkorn, P.-M. Kloetzel, *Transl. Oncol.* **2014**, *7*, 570-579.
- [137] L. P. Bialy, U. Kuckelkorn, P. Henklein, J. Fayet, G. M. Wilczynski, A. Kaminski, I. Mlynarczuk-Bialy, *Histol. Histopathol.* **2018**, 18042.
- [138] F. Krusch, Bachelor Thesis, Technische Universität Darmstadt, **2019**.
- [139] D. Bensinger, D. Stubba, A. Cremer, V. Kohl, T. Waßmer, J. Stuckert, V. Engemann, K. Stegmaier, K. Schmitz, B. Schmidt, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 2428-2446.

- 
- [140] A. V. Statsuk, D. J. Maly, M. A. Seeliger, M. A. Fabian, W. H. Biggs, D. J. Lockhart, P. P. Zarrinkar, J. Kuriyan, K. M. Shokat, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17568-17574.
- [141] S. Eid, S. Turk, A. Volkamer, F. Rippmann, S. Fulle, *BMC Bioinf.* **2017**, *18*, 16.
- [142] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nature Methods* **2012**, *9*, 671-675.
- [143] S. R. Mandadapu, M. R. Gunnam, K.-C. Tiew, R. A. Z. Uy, A. M. Prior, K. R. Alliston, D. H. Hua, Y. Kim, K.-O. Chang, W. C. Groutas, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 62-65.
- [144] T. Neumann, L. Benajiba, S. Göring, K. Stegmaier, B. Schmidt, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8907-8919.
- [145] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.

Daniel Stubba

17. Januar 2020

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

---

*(Daniel Stubba)*

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass die elektronische Version der Doktorarbeit mit der schriftlichen Version übereinstimmt. Die elektronische Version liegt dem Prüfungssekretariat vor.

---

*(Daniel Stubba)*